

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
DI VITERBO**



**DIPARTIMENTO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE
ISTITUTO REGINA ELENA
ROMA**

**Corso di Dottorato di Ricerca in Genetica e Biologia Cellulare
-XXII CICLO-**

**RUOLO DELLA CHINASI PRO-APOPTOTICA HIPK2
NELLA RISPOSTA AI FARMACI ANTINEOPLASTICI:
FOSFORILAZIONE E DEGRADAZIONE
DELL'ONCOGENE DELTAN $p63\alpha$
(MED/04)**

Coordinatore: Prof. Giorgio Pranterà

Tutor: Dott.ssa Silvia Soddu

Dottoranda: Dott.ssa Chiara Lazzari

INDICE

RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	4
La risposta cellulare al danno al DNA: ruolo dell'oncosoppressore p53 e del suo attivatore HIPK2	4
La chinasi HIPK2	8
Struttura e regolazione della proteina HIPK2	8
Ruolo di HIPK2 nell'apoptosi	12
Ruolo di HIPK2 come oncosoppressore	15
p63 e la famiglia genica p53	17
Struttura e funzioni di p63	18
Proprietà oncogeniche dell'isoforma DeltaNp63 α	21
Ruolo di DeltaNp63 α nella risposta cellulare allo stress	23
SCOPO DEL LAVORO	25
RISULTATI	26
La chinasi HIPK2 è coinvolta nella risposta cellulare ai farmaci antineoplastici	26
HIPK2 media la degradazione di DeltaNp63 α in risposta all'Adriamicina	30
Il dominio carbossi-terminale di DeltaNp63 α è richiesto per la degradazione indotta dall'Adriamicina	34
La degradazione di DeltaNp63 α dipende dall'attività chinasica di HIPK2	36
HIPK2 fosforila il residuo Treonina 397 di DeltaNp63 α	38
DISCUSSIONE	41
MATERIALI E METODI	46
Linee cellulari, condizioni di coltura e trattamento con i farmaci	46
Saggi di clonogenicità	46
Vettori d'espressione e trasfezioni	47

Interferenza mediata da RNA	47
Estrazione dell' RNA e <i>Real time Reverse Transcription-PCR</i>	48
Analisi mediante Western Blot	48
Saggi di <i>pull down</i> in vitro	49
Saggi chinasi in vitro	50
BIBLIOGRAFIA	51

RIASSUNTO

HIPK2 è una serina treonina chinasi nucleare identificata inizialmente per la sua interazione con i fattori di trascrizione omeodominio. HIPK2 è coinvolta in numerosi processi cellulari quali regolazione della trascrizione, controllo della proliferazione, sviluppo, differenziamento e risposta al danno al DNA, grazie all'interazione con un numero crescente di proteine. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato il ruolo di HIPK2 nell'apoptosi indotta da danno genotossico, grazie alla fosforilazione selettiva di p53 sul residuo serina 46 e la conseguente attivazione dei geni pro-apoptotici bersaglio di tale oncosoppressore. Dal momento che p53 ha un ruolo chiave per la sensibilità delle cellule tumorali ai farmaci antineoplastici, ci siamo chiesti se anche il suo attivatore pro-apoptotico, HIPK2, fosse coinvolto in questo tipo di risposta. Abbiamo osservato la stabilizzazione della proteina HIPK2 in seguito al trattamento con diversi farmaci, quali Adriamicina, Etoposide o Bleomicina; inoltre, la deplezione di HIPK2 mediante RNAi induce una forte resistenza alle droghe. In maniera interessante, abbiamo riscontrato che HIPK2 media la risposta ai farmaci antineoplastici attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti da p53, come dimostrato dall'induzione di resistenza alle droghe in seguito all'interferenza di HIPK2 nelle cellule prive di p53.

L'oncogene DeltaNp63 α è un membro della famiglia p53, che agisce come fattore di trascrizione con effetti di dominante negativo nei confronti di p53. In risposta al danno al DNA DeltaNp63 α è fosforilato e indirizzato alla degradazione attraverso il proteasoma. Dal momento che HIPK2 lega tutti i membri della famiglia p53, ci siamo chiesti se l'interazione HIPK2/p63 avesse un ruolo funzionale nella risposta cellulare allo stress genotossico. Attraverso esperimenti di iperespressione, RNAi e studi biochimici, abbiamo dimostrato che DeltaNp63 α è un bersaglio di HIPK2 nella risposta ai farmaci chemioterapici. In particolare, i nostri dati mostrano che, in seguito al trattamento con Adriamicina, HIPK2 fosforila in maniera specifica il residuo treonina 397 di DeltaNp63 α , promuovendone la degradazione via proteasoma.

INTRODUZIONE

LA RISPOSTA CELLULARE AL DANNO AL DNA: RUOLO DELL'ONCOSOPPRESSORE p53 E DEL SUO ATTIVATORE HIPK2

L'integrità genomica è costantemente minacciata da fattori di stress genotossico, ambientali o di derivazione cellulare, quali raggi ultravioletti (UV), radiazioni ionizzanti (IR), agenti alchilanti e specie reattive all'ossigeno (ROS) che inducono diversi tipi di lesione nel DNA, come rotture a doppio o singolo filamento, modificazione delle basi, *crosslink* inter- o intra-filamento o stallo delle forche replicative (Harper and Elledge, 2007). Se il danno al DNA non viene riparato o le cellule danneggiate non vengono eliminate, l'organismo va incontro ad instabilità genomica, una delle principali cause di sviluppo dei tumori. Per questo motivo, gli organismi superiori hanno sviluppato una rete complessa di meccanismi di risposta allo stress genotossico: a seconda del tipo cellulare e dell'entità del danno al DNA, infatti, le cellule eucariotiche innescano vie di segnalazione che portano all'attivazione dei *checkpoint* del ciclo cellulare, al riparo del DNA e al conseguente recupero dal danno, oppure, nel caso in cui il danno non sia riparabile, all'eliminazione delle cellule danneggiate attraverso la senescenza replicativa o l'apoptosi (Bartek and Lukas, 2001). Studi recenti supportano l'idea che la risposta cellulare al danno al DNA (DDR) costituisca una barriera innata contro la trasformazione cellulare e la tumorigenesi. È stato dimostrato, infatti, che la DDR, attivata non solo in risposta allo stress genotossico, ma anche in seguito a trasformazione oncogenica, è costitutivamente attiva nelle lesioni precancerose e porta alla senescenza replicativa (Bartkova et al., 2005; Di Micco et al., 2006; Bartkova et al., 2006).

L'oncosoppressore p53 è tra i principali regolatori della risposta cellulare al danno al DNA ed ha, quindi, un ruolo chiave nel mantenimento della stabilità genomica, attraverso la regolazione trascrizionale di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, nel differenziamento, nella senescenza replicativa e nell'apoptosi (Oren, 2003; Vousden and Lu, 2002; Moll et al., 2005). Il 50% dei tumori umani presenta mutazioni nel gene *TP53*, che portano all'espressione di una proteina inattiva o alla completa perdita di espressione di essa; anche nei tumori che esprimono p53 nativa la proteina risulta non funzionante a causa di alterazioni dei meccanismi

molecolari che ne controllano l'attività. In entrambi i casi, l'impossibilità di attivare la risposta apoptotica innescata da p53 non solo favorisce la progressione tumorale, ma rende le cellule resistenti ai trattamenti radio- e chemioterapici (Hollstein et al., 1991).

In assenza di stimoli genotossici, p53 è una proteina con emivita breve, la cui espressione è mantenuta a livelli molto bassi, a volte non rilevabili. Il principale responsabile di questa regolazione negativa è la proteina MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) (Marine et al., 2006), una E3 ubiquitina ligasi che lega e inattiva p53, sia reprimendo la sua attività trascrizionale sia promuovendone l'ubiquitinazione e la degradazione via proteasoma (Honda et al., 1997; Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). In risposta al danno al DNA p53 viene stabilizzata grazie a modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazioni e acetilazioni, ad opera di enzimi specifici attivati dal danno; tali modificazioni consentono a p53 di sfuggire al controllo di MDM2 e di accumularsi nel nucleo in una forma trascrizionalmente attiva (Vousden, 2000). In particolare, è noto che le chinasi ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) e ATR (ATM e Rad3-related) (Shiloh, 2003; Abraham, 2001) fosforilano p53 nel residuo serina 15, mentre le chinasi Chk1 e Chk2 nel residuo serina 20 e che tali modificazioni stabilizzano e attivano p53 in seguito a stress genotossico (Bode and Dong, 2004). Questi eventi sono indipendenti dall'entità del danno, in quanto si verificano sia in seguito a danni citostatici che letali e non spiegano, quindi, i diversi tipi di risposta biologica (arresto del ciclo cellulare, apoptosi o senescenza replicativa) mediati da p53. Tra le modificazioni post-traduzionali, la fosforilazione di p53 nel residuo serina 46 (Bulavin et al., 1999; Oda et al., 2000), o del suo omologo murino, serina 58 (Cecchinelli et al., 2006a), è stata definita come evento specifico coinvolto nella regolazione dell'apoptosi. È stato dimostrato, infatti, che in seguito a danno severo al DNA, la fosforilazione della serina 46 promuove un cambiamento nell'affinità di p53 per i promotori dei suoi geni bersaglio, indirizzandola preferenzialmente sui geni pro-apoptotici, quali *BAX*, *PIG* e *PTEN*, piuttosto che su quelli coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, come *p21^{Waf1}* (Oda et al., 2000; Mayo et al., 2005; Cecchinelli et al., 2006b). Per questo motivo la fosforilazione del residuo serina 46 è stata definita da Oda e collaboratori "il punto di non ritorno", perché attiverebbe in maniera irreversibile la risposta apoptotica nelle cellule danneggiate (Oda et al., 2000) (Figura 1).

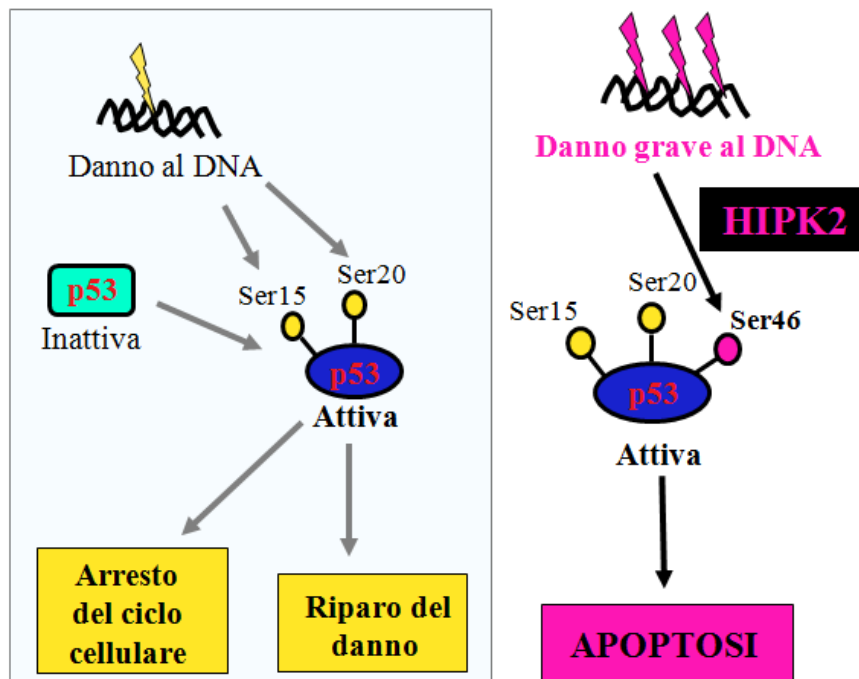


Figura 1 – Modificazioni post-traduzionali e attivazione di p53 in risposta allo stress genotossico

Questo modello è ulteriormente supportato dall'osservazione che il polimorfismo di p53 al codone 47 è rilevante dal punto di vista funzionale: la sostituzione in tale codone del residuo di prolina, che appartiene alla sequenza consenso di fosforilazione della serina 46, con una serina, porta alla riduzione di fosforilazione della serina 46 e ad una ridotta capacità di p53 di attivare l'apoptosi (Li et al., 2005). Inoltre, è stato dimostrato che la resistenza di alcune cellule tumorali all'apoptosi indotta dalla ricostituzione dell'espressione di p53 dipende da un difetto nella fosforilazione della serina 46 e può essere superata attraverso la trasduzione di una forma mutata di p53, in cui è mimata la fosforilazione di tale residuo (Ohtani et al., 2004; Rodicker and Putzer, 2003; Ichwan et al., 2005).

Una delle chinasi coinvolte nell'attivazione di p53 in senso apoptotico è HIPK2, una serina/treonina chinasi altamente conservata e localizzata prevalentemente nei *Nuclear Bodies* (NB) ed in altri *speckle* nucleari (Hofmann et al., 2002; D'Orazi et al., 2002; Rinaldo et al., 2008). In seguito a danno grave al DNA, HIPK2 forma un complesso con p53 e la fosforila in serina 46 (Di Stefano et al., 2004; Dauth et al., 2007); un meccanismo di regolazione analogo è stato individuato nel topo, in cui HIPK2 è in grado di fosforilare p53 in serina 58 (Cecchinelli et al., 2006a). La regolazione di p53 da parte di HIPK2 dipende dalla sua interazione con numerosi altri fattori; uno di questi è la proteina PML (Promyelocytic Leukemia Protein), un cofattore

fondamentale per la fosforilazione della serina 46 dipendente da HIPK2 (Moller et al., 2003a): in seguito a danno al DNA, infatti, il complesso HIPK2/p53 è reclutato nei PML-NB in maniera dipendente da PML stessa. All'interno dei NB, HIPK2 interagisce anche con l'acetiltransferasi CBP (Creb Binding Protein) che, in seguito alla fosforilazione della serina 46, media l'acetilazione di p53 in corrispondenza delle lisine 373 e 382 (Hofmann et al., 2002). Questa modificazione ha un ruolo chiave nell'induzione dell'apoptosi e della senescenza indotte da p53 ed entrambe le risposte sono state collegate ai PML-NB. Altri cofattori di HIPK2 nella fosforilazione della serina 46 e nella conseguente attivazione dell'apoptosi dipendente da p53 sono l'Axiina, una proteina *scaffold* che fa parte della via di segnalazione di Wnt/ β -catenina (Rui et al., 2004), Daxx (Li et al., 2007) e il fattore inducibile da p53 p53DINP1/TP53INP1 (Okamura et al., 2001; Tomasini et al., 2003).

Numerosi studi hanno evidenziato che esiste un circuito di regolazione molto complesso tra HIPK2 e il suo bersaglio p53 che coinvolge anche il maggior regolatore negativo di p53, MDM2. È stato dimostrato, infatti, che HIPK2 ristabilisce l'attività trascrizionale apoptotica di p53, interferendo con la funzione inibitoria di MDM2 e prevenendone sia l'ubiquitinazione che il trasporto nel citoplasma e, quindi, la degradazione (Di Stefano et al., 2004b). Questo scenario è complicato dal fatto che p53, oltre ad essere bersaglio diretto di HIPK2, ne regola a sua volta l'attività: in un lavoro pubblicato nel 2007, infatti, Rinaldo e collaboratori hanno mostrato che p53 inibisce il suo attivatore pro-apoptotico HIPK2, mediandone l'ubiquitinazione da parte di MDM2 e la degradazione via proteasoma; gli autori mostrano come, in presenza di danno subletale al DNA, l'inibizione della degradazione di HIPK2 sia sufficiente per indurre la fosforilazione di p53 in serina 46 e l'apoptosi, convertendo uno stimolo di arresto proliferativo in uno apoptotico (Rinaldo et al., 2007a). Questi risultati suggeriscono un modello secondo il quale, in condizioni di arresto proliferativo, p53 inibisce la sua stessa fosforilazione della serina 46, grazie alla degradazione di HIPK2, supportando l'idea che le funzioni di arresto proliferativo di p53 includano l'inibizione di quelle apoptotiche, che le due diverse risposte biologiche siano mutuamente esclusive e che la fosforilazione della serina 46, catalizzata da HIPK2, sia l'evento responsabile dello spostamento trascrizionale che decide il destino della cellula in caso di danno al DNA di diversa intensità.

LA CHINASI HIPK2

Il gene umano che codifica la proteina HIPK2 (Homeodomain Interacting Protein Kinase 2) è stato isolato e mappato sul cromosoma 7q32-34 (Hofmann et al., 2000). Il suo prodotto proteico è una serina treonina chinasi individuata alla fine degli anni '90 come membro di una nuova famiglia di corepressori per i fattori di trascrizione omeodominio (Kim et al., 1998). Alla stessa famiglia appartengono anche le proteine HIPK1 e HIPK3, che condividono la caratteristica di avere un dominio chinasi conservato e un dominio di legame alle proteine omeodominio. HIPK4, quarto membro meno conservato della famiglia, è stato identificato successivamente mediante analisi computerizzate delle sequenze ottenute dalla decifrazione del genoma umano (Manning et al., 2002). Tali analisi hanno rilevato la presenza di una sequenza codificante in cui è presente il motivo catalitico proprio delle proteine chinasi.

L'elevata omologia di sequenza che contraddistingue le chinasi HIPK1, HIPK2 e HIPK3 suggerisce una ridondanza funzionale. Ciò sembra confermato dal fenotipo dei topi *knock out* (KO): infatti, mentre i singoli KO per *Hipk1* o *Hipk2* sono perlopiù normali (Kondo et al., 2003; Wiggins et al., 2004), gli embrioni doppi KO *Hipk1/Hipk2* muoiono prima della nascita, mostrando varie anomalie che includono difetti nella ematopoiesi e nella formazione dei vasi sanguigni (Isono et al., 2006; Rinaldo et al., 2007b). HIPK3 e HIPK4 sono i membri meno caratterizzati della famiglia.

Struttura e regolazione della proteina HIPK2

HIPK2 è una serina treonina chinasi di 1189 amminoacidi prevalentemente nucleare, molto conservata nei Vertebrati e con un altissimo grado di omologia tra uomo e topo (98%). L'RNA messaggero di HIPK2 è espresso a livelli alti durante le ultime fasi dell'embriogenesi,

preferenzialmente nella retina, nel muscolo e nel tessuto neuronale, ed è ubiquitario nell'uomo e nel topo adulti (Pierantoni et al., 2002).

Dal punto di vista strutturale HIPK2 presenta diversi domini: un regione N-terminale in cui sono presenti un sito di sumulazione e un dominio chinasico, seguito da un dominio di interazione con i fattori omeodominio, una regione PEST e una regione C-terminale che include un segnale di ritenzione negli *speckle* nucleari, un putativo dominio autoinibitorio e un sito di ubiquitinazione (Figura 2).

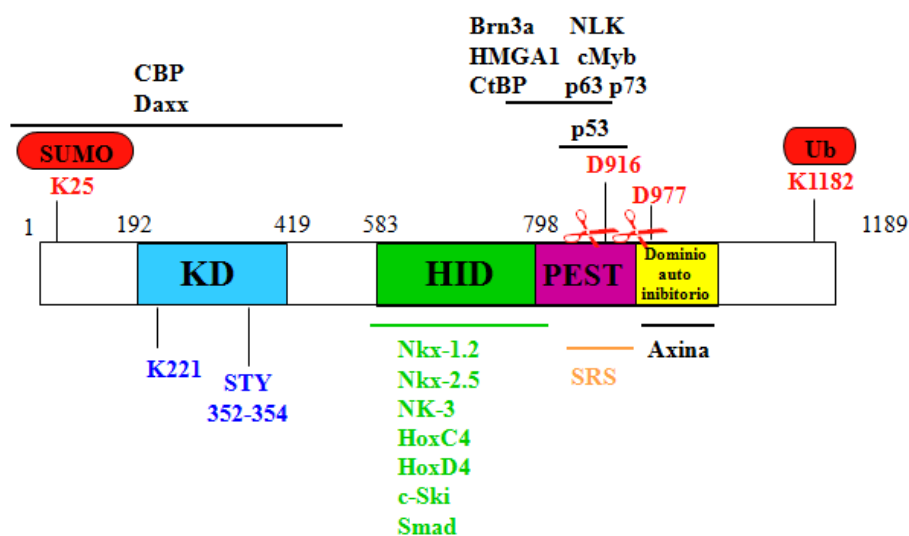


Figura 2 – Rappresentazione schematica della proteina HIPK2 murina. Le linee orizzontali al di fuori dei riquadri mostrano le regioni coinvolte nel legame con le proteine indicate. K25: sito di sumulazione KD: dominio chinasico, al cui interno K221 è la lisina del sito catalitico e STY il sito regolativo putativo. HID: dominio di interazione con i fattori omeobox; PEST: regione contenente le sequenze PEST; D916 E D977 siti di taglio ad opera delle caspasi (indicati dalle forbici); SRS: segnale di ritenzione negli *speckle*; K1182: sito di ubiquitinazione (*modificato da Rinaldo et al., 2007b*).

Il dominio chinasico è simile a quello della p38MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), molto conservato tra i membri della famiglia HIPK e nel corso dell'evoluzione. Il sito catalitico, K221, e il così detto “loop di attivazione” (STY), inoltre, sono sequenze consenso presenti nel dominio chinasico della sottofamiglia DYRK (Dual-Specificity Tyrosine (Y)-phosphorylation Regulated Kinase), che include proteine presenti in *Drosophila* e

Caenorhabditis Elegans (Hofmann et al., 2000). È stato dimostrato che HIPK2 è in grado di fosforilare se stessa in vitro (D’Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002) e molti dei suoi bersagli sia in vitro che in vivo e la sua attività chinasi è richiesta spesso per la regolazione della trascrizione mediata da HIPK2.

Il dominio homeobox media l’interazione con i fattori di trascrizione omeodominio delle famiglie NK e HOX. HIPK2, infatti, è stata identificata mediante un saggio di doppio ibrido per la sua capacità di legare l’omeoproteina murina Nkx-1.2 (Kim et al., 1998); tra i fattori omeobox che interagiscono con HIPK2, inoltre, è stato studiato in dettaglio il suo legame con NK-3: in questo contesto HIPK2 agisce da corepressore trascrizionale, aumentando la capacità di legame al DNA di NK-3 e potenziando la sua funzione repressiva (Kim et al., 1998). Studi successivi hanno mostrato che NK-3, reclutando HIPK2, il corepressore Graucho e una deacetilasi istonica, promuove la formazione di un complesso coinvolto nel rimodellamento della cromatina, con la funzione di reprimere la trascrizione (Choi et al., 1999). Il dominio di interazione con le proteine omeobox è responsabile anche del legame con il proto-oncogene c-Ski e gli attivatori trascrizionali Smad1-4. Tali fattori sono coinvolti nella via di trasduzione del segnale innescata da TGF β (Transforming Growth Factor β), BMP (Bone Morphogenetic Protein) e attivina. HIPK2, insieme a c-Ski, gioca un ruolo importante nella regolazione negativa della trascrizione indotta dalle suddette vie di segnalazione (Harada et al., 2003).

Diversamente da quanto si verifica di solito (Rechsteiner and Rogers, 1996), la regione contenente la sequenza PEST [regione idrofila ricca in residui di prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T)] non è coinvolta nella degradazione proteolitica (Rinaldo et al., 2007a), bensì media l’interazione con la maggior parte dei fattori non omeobox che legano HIPK2, tra cui p53 e gli altri membri della sua famiglia, p73 e p63 (Kim et al., 1998), CtBP, HMGA e numerose altre proteine. Il segnale di ritenzione nucleare è coinvolto nella localizzazione sub-nucleare di HIPK2, in corrispondenza di strutture che in parte corrispondono ai PML-NB (come descritto precedentemente in questa tesi), in parte costituiscono delle strutture distinte da essi, dette “HIPK *bodies*”. Esse sono un altro tipo di *speckle* nucleari nei quali HIPK2 co-localizza con HIPK3 (Roscic et al., 2006); il reclutamento di HIPK2 negli HIPK *bodies* è stato correlato alla repressione trascrizionale mediata da HIPK2 stessa (Roscic et al., 2006).

Il ruolo attribuito al putativo dominio di autoinibizione deriva dall’osservazione di un’aumentata attività chinasi di HIPK2 in seguito all’eliminazione di esso (Rui et al., 2004; Gresko et al., 2006). In particolare, ci sono evidenze secondo le quali, in seguito a radiazioni

UV, HIPK2 forma un complesso multimerico con p53 e con l'Axina che stimola la trascrizione dei geni pro-apoptotici bersaglio di p53 (Rui et al., 2004; Li et al., 2007). È stato suggerito che l'Axina occupi fisicamente il potenziale dominio autoinibitorio di HIPK2, permettendone, in questo modo, l'attivazione (Rui et al., 2004). L'esistenza del dominio autoinibitorio è supportata, inoltre, dall'osservazione che questa stessa regione è tagliata proteoliticamente ad opera delle caspasi durante l'apoptosi, e che mutanti di HIPK2 resistenti al taglio caspasico inducono l'apoptosi in maniera meno efficiente (Gresko et al., 2006).

Oltre al *loop* di attivazione STY, sono stati identificati e caratterizzati altri due siti di modificazione post-traduzionale nella proteina HIPK2: il sito di sumulazione, in corrispondenza della lisina 25 (Gresko et al., 2005; Hofmann et al., 2005; Sung et al., 2005) e il sito di ubiquitinazione, sul residuo lisina 1182 (Rinaldo et al., 2007a). La sumulazione è stata correlata sia all'attivazione di HIPK2 che alla sua attività sui fattori bersaglio, mentre l'ubiquitinazione è stata associata, fino ad ora, all'inattivazione di HIPK2. In particolare, in seguito a danno al DNA, HIPK2 fosforila la sua E3 SUMO ligasi Pc2, che a sua volta sumula HIPK2, stabilendo un circuito di regolazione positiva che potenzia l'abilità di HIPK2 di agire da repressore trascrizionale (Rosic et al., 2006). Al contrario, l'ubiquitinazione di HIPK2, mediata dalla E3 ubiquitina ligasi MDM2, promuove la sua degradazione via proteasoma (Rinaldo et al., 2007a). In maniera interessante, il sito di ubiquitinazione è situato nel dominio autoinibitorio ed è eliminato ad opera delle caspasi, per la completa attivazione della funzione apoptotica di HIPK2 (Gresko et al., 2006). Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un secondo circuito di regolazione positiva, in cui l'attività apoptotica di HIPK2 è potenziata in seguito alla delezione della regione critica per la degradazione mediata da MDM2. In accordo con questo modello, un mutante di HIPK2 resistente alla degradazione, HIPK2^{K1182R}, ha un'aumentata attività apoptotica (Rinaldo et al., 2007a).

Come descritto nella prima parte di questa tesi, l'ubiquitinazione di HIPK2 da parte di MDM2 ne regola l'attività in presenza di un danno subletale al DNA, prevenendo la fosforilazione di p53 in serina 46 e l'attivazione dell'apoptosi. Recentemente sono state identificate altre E3 ubiquitina ligasi responsabili del controllo della stabilità di HIPK2 sia in condizioni normali che in seguito a stimoli di varia natura: è stato dimostrato, infatti, che la ligasi WSB-1 (WD-repeat and suppressor of cytokine signaling box-containing-1) e le proteine Siah-1 e Siah-2 (Seven absentia homolog), appartenenti alla famiglia delle ligasi *Ring Finger*, legano HIPK2 catalizzandone la poli-ubiquitinazione e la degradazione via proteasoma e regolandone sia

il *turn-over*, in condizioni normali, che l'attivazione in risposta al danno grave al DNA o all'ipossia (Choi et al., 2008; Winter et al., 2008; Kim et al., 2009; Calzado et al., 2009).

Ruolo di HIPK2 nell'apoptosi

HIPK2 è stata identificata inizialmente come un regolatore trascrizionale e un corepressore per i fattori di trascrizione omeodominio; negli ultimi anni, tuttavia, molti studi hanno evidenziato il suo coinvolgimento anche in altri processi biologici, quali sviluppo embrionale, differenziamento, proliferazione e apoptosi, grazie all'interazione con un numero crescente di proteine (Rinaldo et al., 2007b; Calzado et al., 2007) (Figura 3). In particolare è stato ben caratterizzato il ruolo di HIPK2 come attivatore dell'apoptosi, sia in risposta allo stress genotossico e all'ipossia, che durante lo sviluppo embrionale.

Il ruolo di HIPK2 nell'apoptosi dipendente da p53 e indotta da danno grave al DNA è stata descritta precedentemente in questa tesi e riguarda la fosforilazione della serina 46 e la conseguente attivazione dei geni pro-apoptotici bersaglio di p53, quali *PIG3*, *BAX*, *NOXA* e *p53AIP1*, così come la repressione di quelli anti-apoptotici, quali la *Galectina-3* e *MDM2* (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Di Stefano et al., 2004; Cecchinelli et al., 2006b; Mayo et al., 2005).

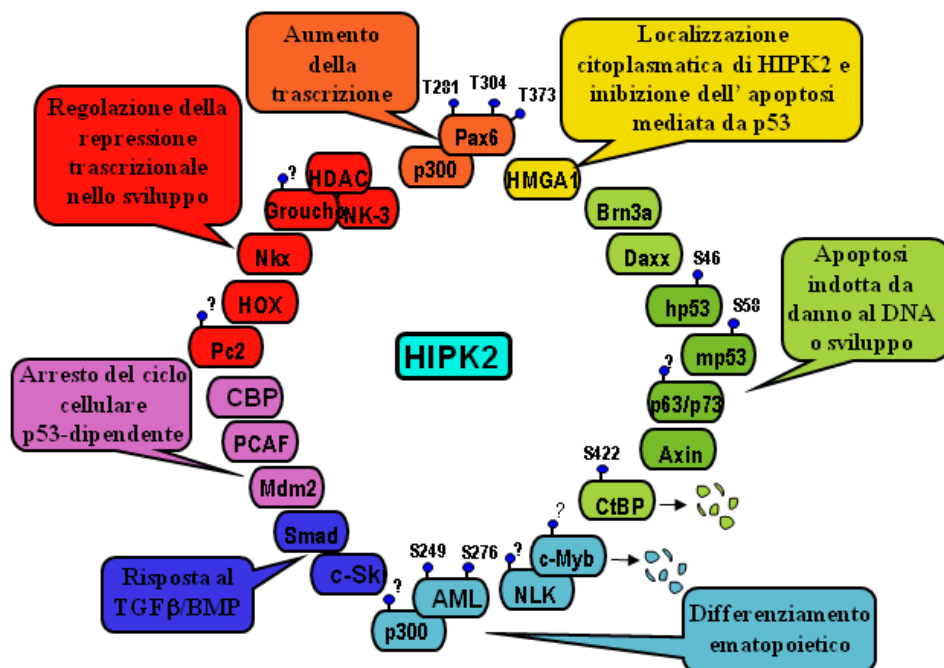


Figura 3 – Rappresentazione schematica dei fattori che interagiscono con HIPK2. Delle proteine riportate sono indicate l'attività biologica e i siti di fosforilazione da parte di HIPK2 (*modificato da Rinaldo et al., 2007b*).

Le funzioni pro-apoptotiche di HIPK2, tuttavia, non sono limitate alla sua azione su p53, ma coinvolgono anche vie di segnalazione indipendenti da essa. È stato dimostrato che, in cellule tumorali prive di p53, HIPK2 lega il fattore anti-apoptotico CtBP (transcription corepressor C-terminal Binding Protein), fosforilandolo in corrispondenza del residuo serina 422 e indirizzandolo, in questo modo, alla degradazione via proteasoma. La diminuzione dei livelli proteici di CtBP che ne risulta sensibilizza le cellule all'apoptosi (Zhang et al., 2003). La fosforilazione della serina 422 di CtBP è mediata da HIPK2 sia direttamente che indirettamente, attraverso la via di segnalazione delle JNK (Wang et al., 2006) e avviene in risposta a stress genotossico, quale raggi UV o trattamento con Cisplatino. In cellule di epatoma prive di p53, inoltre, HIPK2 media l'apoptosi indotta dal TGF β , anche in questo caso attraverso l'attivazione della via di segnalazione delle JNK (Hofmann et al., 2003). Un altro bersaglio di HIPK2

nell'induzione della morte cellulare programmata è la proteina PML; è stato recentemente dimostrato che, oltre ad essere un bersaglio diretto di p53 in risposta a stimoli apoptotici, PML è stabilizzata da HIPK2 mediante fosforilazione diretta sui residui serina 8 e serina 38 e che tali modificazioni post-traduzionali contribuiscono alla funzione pro-apoptotica di PML, in maniera indipendente da p53 (Gresko et al., 2009).

È stato descritto un ruolo di HIPK2 nella morte cellulare programmata associata allo sviluppo neuronale, sia in studi effettuati sia in vivo, su topi geneticamente modificati, che in modelli di sviluppo neuronale in vitro. Gli embrioni provenienti dai topi doppio KO *Hipk1/Hipk2* mostrano difetti nella chiusura del neuroporo anteriore, sono caratterizzati da esoencefalia, ovvero eccesso di tessuto neuronale dovuto ad una ridotta apoptosi, ad una aumentata proliferazione o ad entrambe le cose, e vengono progressivamente persi tra i 9,5 e i 12,5 giorni post-coitus (Zhang et al., 2007). Inoltre, nei neuroni del topo singolo KO *Hipk2* sono stati riportati difetti di proliferazione e di sopravvivenza: in particolare è stato dimostrato che HIPK2 controlla la sopravvivenza dei neuroni sensoriali, grazie alla sua interazione con il fattore di trascrizione anti-apoptotico Brn3a, sopprimendo la trascrizione di geni anti-apoptotici quali *Bcl-x* e *TrkA*, dipendente da Brn3a stessa (Wiggins et al., 2004). È stato dimostrato, inoltre, un ruolo di HIPK2, dipendente da Bax, nell'apoptosi associata allo sviluppo dei neuroni sensoriali e simpatici, in risposta alla deprivazione di neurotrofina (Doxakis et al., 2004).

Diversamente da quanto avviene nei neuroni sensoriali, l'espressione di HIPK2 nei neuroni dopaminergici è richiesta per la sopravvivenza mediata dal TGFβ durante la morte cellulare programmata. I topi *Hipk2*^{-/-}, infatti, mostrano un grave disturbo neurodegenerativo, caratterizzato dalla perdita selettiva, per apoptosi, dei neuroni dopaminergici della sostanza grigia, che porta ad anomalie psicomotorie e ad un fenotipo simile a quello del morbo di Parkinson. In questo caso HIPK2 agisce sulla via di segnalazione del TGFβ grazie all'interazione con il fattore di trascrizione Smad3, in maniera indipendente dall'attività chinasi (Zhang et al., 2007). Questi risultati suggerirebbero un ruolo di HIPK2 come fattore di sopravvivenza, piuttosto che attivatore dell'apoptosi, nei neuroni dopaminergici ed evidenziano come, a seconda del contesto cellulare e dell'interazione con fattori diversi, HIPK2 sia in grado di mediare risposte anche divergenti all'interno della cellula.

Ruolo di HIPK2 come oncosoppressore

Studi recenti, effettuati su topi geneticamente modificati, hanno mostrato che HIPK2 esercita una funzione oncosoppressiva nella pelle (Wei et al., 2007). Infatti, in un modello di carcinogenesi a due stadi, in cui è stato utilizzato il DMBA (DiMetil-Benzo-Antracene) come iniziatore e il TPA (Antigene Polipetidico Tissutale) come promotore, Wei e i suoi colleghi hanno mostrato che i topi *Hipk2*^{-/-} e quelli *Hipk2*^{+/-} sono pronti alla formazione di tumori a carico della pelle. Sia negli animali omozigoti che in quelli eterozigoti si osserva una rapida progressione dei tumori a carcinomi, che correla con aumentati livelli di espressione della ciclina D (Wei et al., 2007). Questi dati in vivo supportano l'idea che i livelli di espressione di HIPK2 siano cruciali per il controllo della crescita cellulare aberrante.

I dati riguardanti la regolazione di HIPK2 nel cancro sono piuttosto frammentari; tuttavia, in accordo con un suo possibile ruolo oncosoppressivo, i tumori umani mostrano la tendenza ad inattivare HIPK2 attraverso molteplici meccanismi. I primi studi in tal senso riportano la sua diminuzione a livello trascrizionale in molti tumori della tiroide e della mammella, in confronto alla loro controparte normale, anche se non è stato spiegato il ruolo di questa regolazione negativa dal punto di vista funzionale (Pierantoni et al., 2002). Sono state identificate, inoltre, due mutazioni missenso all'interno del segnale di ritenzione negli *speckle* di HIPK2, in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML) e sindrome mielodisplastica (MDS). Tali mutazioni portano ad una distribuzione aberrante di HIPK2, diffusa all'interno di tutto il nucleo, che compromette la regolazione trascrizionale ad opera di AML1 e p53 (Li et al., 2007). Tuttavia la forma mutata di HIPK2 è stata trovata con una frequenza molto bassa (2 casi su 130) e, per ora, non è stato attribuito ad HIPK2 un ruolo causale nella trasformazione cellulare che porta allo sviluppo delle leucemie.

In uno studio recente Wee e i suoi collaboratori hanno mostrato che una proteina di fusione, potenzialmente leucogenica, formata da PEBP2 β (chiamata anche CBF β) e SMMHC, rilocalizza HIPK2 nel citoplasma, in corrispondenza di strutture filamentose, impedendo in questo modo la fosforilazione di p300 nel nucleo (Wee et al., 2008). Il reclutamento di HIPK2 nel citoplasma, e quindi l'inibizione delle sue funzioni nucleari, sembrano essere un meccanismo di inattivazione di HIPK2 nei tumori. Infatti, è stato descritto che in molti tumori della mammella, l'iperespressione dell'oncogene HMGA1 (High Mobility Group 1) promuove la

rilocalizzazione citoplasmatica di HIPK2, interferendo con la fosforilazione di p53 in serina 46 e con la trascrizione dei geni pro apoptotici bersaglio di p53 stessa (Pierantoni et al., 2007). In maniera interessante, nei carcinomi umani della mammella che iperesprimono HMGA1 la localizzazione di HIPK2 nel citoplasma correla con un basso grado di apoptosi spontanea (Pierantoni et al., 2007).

In contrasto con quanto descritto fino ad ora, Al-Beiti e colleghi hanno riportato recentemente un ruolo di HIPK2 nella progressione tumorale del carcinoma della cervice, mostrando l'espressione di HIPK2 nel 75% dei tumori analizzati, contro il 10% di espressione nei tessuti normali di controllo (Al-Beiti et al., 2008). Inoltre, è stato suggerito che in alcuni tumori l'iperespressione di HIPK2 sia vantaggiosa per la progressione tumorale: HIPK2, infatti, è espresso a livelli molto alti in circa due terzi degli astrocitomi, che sono gliomi relativamente benigni che si manifestano durante l'infanzia o i primi anni dell'adolescenza, e che, spesso, evolvono in altri tipi di glioma (Deshmukh et al., 2008).

p63 e LA FAMIGLIA GENICA p53

Il gene *TP63*, nell'uomo localizzato sul cromosoma 3q27-29, appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione, chiamata “famiglia p53”, di cui fanno parte anche gli oncosoppressori *TP53* e *TP73* (Kaghad et al., 1997; Yang et al., 1998). Nonostante *TP63* sia stato l'ultimo ad essere identificato, un gene simil-p63 è considerato il progenitore ancestrale della famiglia (Melino et al., 2002; Yang et al., 2002).

L'elevata similitudine strutturale che accomuna p63, p53 e p73 ha portato, inizialmente, alla speculazione che potessero avere lo stesso ruolo nei tumori umani (Yang and McKeon, 2000; Melino et al., 2003; Moll and Slade, 2004). Esse, infatti, presentano l'organizzazione modulare tipica dei fattori di trascrizione, caratterizzata da un dominio di transattivazione (TA), all'estremità N-terminale, un dominio di legame al DNA (DBD), nella parte centrale, e un dominio di oligomerizzazione (OD) all'estremità C-terminale della proteina (Yang and McKeon, 2000) (Figura 4). La marcata omologia di sequenza nel DBD (> 60%) e nell'OD (De Laurenzi and Melino, 2000) ha suggerito che p53, p63 e p73 potessero regolare un gruppo comune di geni bersaglio, legando gli stessi promotori, sotto forma di complessi sia omo- che etero-tetramERICI. In effetti, è stata descritta un'interazione sia fisica che funzionale tra i vari membri della famiglia (Agami et al., 1999; Gong et al., 1999; Flores et al., 2002; Gressner et al., 2005); tuttavia, p63, p53 e p73 non sono del tutto ridondanti: i topi KO per ognuno di essi mostrano fenotipi distinti, suggerendo che le tre proteine abbiano anche funzioni biologiche specifiche e indipendenti le une dalle altre.



Figura 4 – Comparazione strutturale e omologia di sequenza tra p53, p63 e p73. E' riportata l'organizzazione strutturale schematica delle isoforme TA di p63 e p73. TA: dominio di transattivazione;

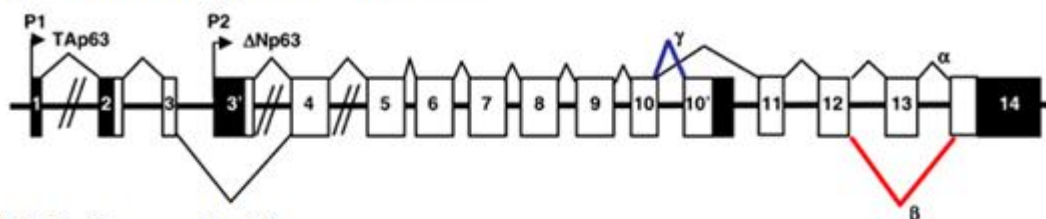
DNA BINDING: dominio di legame al DNA; SAM: sterile alpha motif. Per ogni dominio è indicata la percentuale di omologia di sequenza tra p53/p63 e p53/p73.

Struttura e funzioni di p63

Il gene umano *TP63* è composto da 15 esoni e può dar luogo ad almeno sei prodotti proteici distinti, dovuti sia alla presenza di due promotori alternativi che a *splicing* multiplo dell'mRNA. In particolare, la trascrizione a partire dal promotore P1, situato a monte dell'esone 1, genera le isoforme TAp63, caratterizzate dalla presenza di un dominio N-terminale di transattivazione omologo a quello di p53, mentre le isoforme trascritte a partire dal promotore P2 e contenenti un esone aggiuntivo (esone 3'), entrambi situati all'interno dell'introne 3, mancano di tale regione e sono dette isoforme DeltaNp63 (ΔN) (Yang et al., 1998). Un'ulteriore grado di complessità è aggiunto dalla presenza di isoforme (sia TA che ΔN) α , β e γ che derivano da *splicing* alternativo dell'mRNA e diverse tra loro per l'estremità C-terminale (Bourdon et al., 2005). Le isoforme α sono le sole a contenere un dominio SAM (*Sterile Alpha Motif*), che media l'interazione con altre proteine (Thanos and Bowie, 1999), e un dominio di inibizione della trascrizione (TID, *Transactivation Inhibitory Domain*), che sembra bloccare l'attività trascrizionale di TAp63 α , attraverso associazioni intra- e inter-molecolari con il dominio di transattivazione (Serber et al., 2002) (Figura 5).

Le isoforme TA sono in grado di legare il DNA in corrispondenza dei p53 *Responsive Elements* (p53RE), attivando la trascrizione di molti geni bersaglio di p53 ed esercitando una funzione oncossoppressiva simile a quella di p53 stessa. Esse, infatti, sono coinvolte nella risposta cellulare a vari tipi di stress, e mediano l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi in seguito a danno al DNA. Sono state identificate, inoltre, sequenze consenso esclusive di p63, chiamate p63RE (*p63 Responsive Elements*), attraverso le quali p63 regola l'espressione di geni bersaglio specifici (Osada et al., 2005; Sasaki et al., 2005; Murray-Zmijewski et al., 2006).

a) Struttura del gene *TP63* umano



b) Isoforme di p63

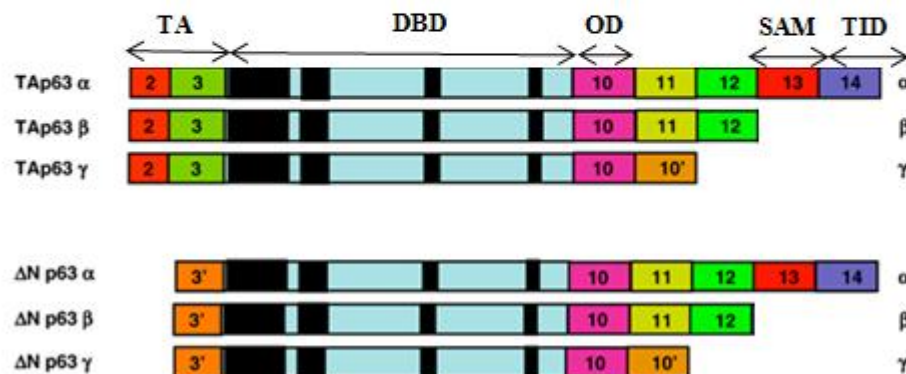


Figura 5 – Struttura e trascritti del gene *TP63*. a) Rappresentazione schematica della struttura introni/esoni che mostra i due siti di inizio della trascrizione (P1 e P2) e lo splicing alternativo (α , β , γ) che portano alla formazione di sei diverse isoforme proteiche. b) Rappresentazione schematica delle isoforme di p63. Sono indicati i diversi domini funzionali: TA, dominio di transattivazione; DBD, dominio di legame al DNA, OD, dominio di oligomerizzazione; SAM: dominio *Sterile Alpha Motif*; TID: dominio di inibizione della transattivazione. I numeri rappresentano gli esoni che codificano le diverse isoforme di p63.

Le isoforme DeltaN, che pur mancando di gran parte del dominio N-terminale presentano un dominio DBD intatto, legano i p53RE e agiscono da dominante negativo rispetto a p53 e alle isoforme TAp63 e TAp73 (Yang et al., 1998), sia competendo con esse per il legame al DNA, sia attraverso l'interazione diretta proteina-proteina, che porta alla formazione di oligomeri inattivi dal punto di vista trascrizionale (Flores et al., 2002; Bakkers et al., 2002; Benard et al., 2003; Westfall et al., 2003; Barbieri et al., 2005). È stato dimostrato, inoltre, che DeltaNp63 ha anche una attività trascrizionale propria, grazie alla presenza di un dominio di transattivazione, diverso da quello canonico, che comprende gli amminoacidi N-terminali, specifici delle isoforme DeltaN, e il dominio ricco in prolina ad essi adiacente (Helton et al., 2006; Dohn et al., 2001).

La proteina p63 è espressa in maniera tessuto- e tipo cellulare-specifica ed è essenziale durante l'embriogenesi, soprattutto per lo sviluppo degli epiteli stratificati e dei tessuti

mesenchimali, come dimostra il fenotipo dei topi *p63*^{-/-} (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Tali topi mostrano gravi difetti nello sviluppo degli arti, dei denti e, in generale, dei tessuti epiteliali quali la pelle e gli epiteli stratificati dell'esofago, della prostata, delle ghiandole mammarie e dell'urotelio, tutte strutture il cui corretto sviluppo dipende dalle interazioni tra epitelio e mesenchima. Il ruolo esatto di p63 nella morfogenesi dell'epidermide è ancora oggetto di studio; il fenotipo osservato su linee indipendenti di topi *p63*^{-/-} suggerisce il suo coinvolgimento in due processi cruciali per lo sviluppo degli epiteli: il mantenimento delle cellule staminali (Yang et al., 1999) e il “*commitment*” da ectoderma maturo a epitelio stratificato (Mills et al., 1999). Mutazioni nel gene *TP63* umano sono state correlate a sindromi dello sviluppo, caratterizzate da displasia dell'ectoderma e anomalie degli arti (van Bokhoven and Brunner, 2002), indicando l'importanza di p63 per la normale morfogenesi degli epiteli anche nell'uomo.

A causa della loro morte prematura, i topi KO per *p63* non possono essere caratterizzati per la loro abilità di sviluppare tumori. Lo studio dei topi eterozigoti *p63*^{+/-}, tuttavia, ha mostrato risultati contrastanti: infatti, Flores e collaboratori hanno riportato che l'aploinsufficienza di *TP63* porta alla formazione di tumori spontanei, diversi da quelli osservati nei topi *p53*^{+/-} e localizzati principalmente negli epiteli stratificati (Flores et al., 2005). Gli stessi autori descrivono, inoltre, come i topi *p63*^{+/-} mostrino segni di invecchiamento prematuro, in accordo con la senescenza e l'invecchiamento osservati in seguito all'eliminazione condizionale di *TP63* nel topo (Flores et al., 2005; Keyes et al., 2005). Tuttavia, in uno studio indipendente, è stato dimostrato che i topi eterozigoti *p63*^{+/-} non sviluppano tumori, né spontanei, né indotti in maniera chimica, anche quando la funzione di p53 è compromessa (Keyes et al., 2006). Questi risultati contrastanti potrebbero essere dovuti all'uso di modelli di topo differenti ed evidenziano come il ruolo di p63 dipenda dal contesto genetico e quindi dal bilanciamento di fattori diversi all'interno dell'organismo.

Attualmente p63 è definito un oncosoppressore “non canonico”: nell'uomo, infatti, *TP63* è mutato molto raramente nei tumori (Osada et al., 1998; Hagiwara et al., 1999); la maggior parte delle neoplasie, inoltre, mantiene l'espressione di p63 e, in molti casi, si trova una iperespressione dell'isoforma DeltaNp63 α , spesso associata all'amplificazione nel locus *TP63* (Hibi et al., 2000; Taniere et al., 2001), indicando un ruolo di p63 anche come fattore oncogenico (Mills, 2006; Murray-Zmijewski et al., 2006).

Proprietà oncogeniche dell'isoforma DeltaNp63 α

L'espressione di *TP63* nei tessuti normali adulti, sia nel topo che nell'uomo, è ristretta ai compartimenti basali degli epiteli stratificati (Yang et al., 1998). Sebbene nelle cellule epiteliali squamose si trovino tutte le varianti di mRNA di p63, è stato dimostrato che DeltaNp63 α è l'isoforma maggiormente espressa a livello proteico, se non addirittura l'unica (Di Como et al., 2002), sia in vivo che nelle colture di cheratinociti primari, con livelli di espressione che diminuiscono durante l'induzione del differenziamento terminale (King et al., 2006). Inoltre, DeltaNp63 α è iperespressa nei carcinomi a cellule squamose della pelle, dell'esofago, del polmone e della cervice uterina (Hibi et al., 2000; Senoo et al., 2001; Lin et al., 2006), oltre che in un gruppo di tumori della mammella con fenotipo epiteliale (Perou et al., 2000; Wang et al., 2002; Koker and Kleer, 2004; Ribeiro-Silva, 2005) spesso a causa di amplificazione genica, supportando un suo ruolo come oncogene.

Le proprietà oncogeniche di DeltaNp63 α derivano sia dalla sua capacità di agire da dominante negativo nei confronti di p53, TAp63 e TAp73 (come descritto sopra), sia da funzioni indipendenti dai membri della famiglia p53.

È stato dimostrato che DeltaNp63 α endogena è associata alla proliferazione dei cheratinociti sia normali che tumorali (Parsa et al., 1999); i cheratinociti *p63*^{+/-}, inoltre, mostrano un minore proliferazione e hanno le caratteristiche di cellule senescenti (Keyes et al., 2005), fenotipo simile a quanto osservato in studi di RNAi (Troung et al., 2006; Sbisa et al., 2006). La deplezione di p63 nei cheratinociti primari umani porta ad una riduzione della proliferazione a causa dell'aumento di espressione di p21, che avviene in maniera indipendente sia da p53 che da p73 e che porta alla senescenza cellulare (DeYoung et al., 2006). È stato dimostrato, inoltre, che l'iperespressione di DeltaNp63 α mantiene in uno stato proliferante i cheratinociti murini, in condizioni che normalmente inducono l'arresto del ciclo cellulare, e aumenta la crescita tumorale sia in vitro che in vivo (King et al., 2003).

Oltre a contribuire alla proliferazione, DeltaNp63 α è coinvolto anche nel differenziamento dei cheratinociti. In particolare è stato dimostrato che la sua funzione è richiesta per l'induzione iniziale del fenotipo differenziato, mentre per il differenziamento terminale è necessaria la diminuzione dei livelli proteici di DeltaNp63 α (King et al., 2003; Parsa et al., 1999; Di Como et al., 2002; Nguyen et al., 2006).

Numerosi studi mostrano il coinvolgimento di DeltaNp63 α nella regolazione negativa dell'apoptosi: in cellule di carcinoma a cellule squamose, l'iperespressione di DeltaNp63 α blocca l'apoptosi dipendente da TAp73 e promuove la sopravvivenza cellulare. Questo effetto è dovuto alla repressione della trascrizione mediata da p73, attraverso il legame di DeltaNp63 α sia ai promotori dei geni bersaglio di p73 che a p73 stessa (Rocco et al., 2006). Altre evidenze che sottolineano il ruolo di DeltaNp63 come fattore di sopravvivenza sono la repressione trascrizionale del gene pro-apoptotico IGFBP3, attraverso il legame diretto del suo promotore (Barbieri et al., 2005) e la regolazione positiva del fattore anti-apoptotico HSP70, la cui iperespressione è associata alla formazione di metastasi (Wu et al., 2005). Tra le proprietà oncogeniche intrinseche di DeltaNp63 α , infine, c'è la sua capacità di modulare l'espressione di proteine correlate allo sviluppo di tumori, quali EGF-R, VEGF e β -catenina (Matheny et al., 2003; Barbieri et al., 2003; Testoni et al., 2006). In particolare è stato dimostrato che DeltaNp63 α è in grado di interagire con il complesso APC, causando l'accumulo nucleare di β -catenina, evento che era stato precedentemente correlato alla proliferazione de-regolata e alla formazione di tumori nei topi (Patturajan et al., 2002).

Ruolo di DeltaNp63 α nella risposta cellulare allo stress

In accordo con il suo ruolo come fattore di sopravvivenza, è stato dimostrato che i livelli di espressione di DeltaNp63 α diminuiscono in risposta ad una serie di stimoli genotossici, quali radiazioni UV e trattamento con Cisplatino.

Le prime evidenze riguardo alla regolazione negativa di DeltaNp63 α in seguito a danno al DNA sono emerse da uno studio di Liefer e collaboratori effettuato su cheratinociti primari di topo, in cui è stato dimostrato che in seguito ad esposizione a raggi UV-b si ha un rapido decremento di espressione di DeltaNp63 α , seguito dalla stabilizzazione della proteina p53 e dall'induzione dell'apoptosi (Liefer et al., 2000; Marchbank et al., 2003). Questi lavori

evidenziano, inoltre, come l'abbassamento dei livelli di espressione di DeltaNp63 α sia necessario per una normale risposta apoptotica, dal momento che l'iperespressione di DeltaNp63 stessa rende i cheratinociti resistenti alla morte cellulare programmata indotta dai raggi UV (Liefer et al., 2000). L'abbassamento dei livelli di espressione di DeltaNp63 α in risposta al danno al DNA è stato osservato anche in cellule tumorali di carcinoma a cellule squamose, in maniera indipendente dallo stato di p53 (Fomenokv et al., 2004). Studi successivi hanno cercato di caratterizzare il meccanismo molecolare responsabile di tale regolazione negativa (Fomenokv et al., 2004; Westfall et al., 2005), dimostrando che, in risposta a stimoli genotossici, i livelli di mRNA di DeltaNp63 α restano invariati (Fomenkow et al., 2004), suggerendo una regolazione post-traduzionale. È stato dimostrato, infatti, che in seguito a radiazioni UV e trattamento con Cisplatino, DeltaNp63 α è fosforilata e indirizzata alla degradazione via proteasoma; in particolare, la fosforilazione indotta dal Cisplatino promuove l'associazione di DeltaNp63 con la stratifina, che ne media il trasporto nel citoplasma e l'interazione con la proteina RACK1 (*Receptor Activated Protein C Kinase 1*); quest'ultima facilita la degradazione proteasomale di DeltaNp63 α (Fomenkov et al., 2004).

Riguardo alle chinasi coinvolte nelle modificazioni post-traduzionali di DeltaNp63 in seguito a stress genotossico e ai siti di fosforilazione specifici si sa ancora poco. È stato riportato che dosi apoptotiche di raggi UV inducono la fosforilazione di DeltaNp63 α da parte di p38 MAPK, permettendone il rilascio dai p53RE e quindi l'attivazione dei geni pro-apoptotici bersaglio di p53 (Papoutsaki et al., 2005).

Quanto alle modificazioni coinvolte nella degradazione via proteasoma di DeltaNp63 α è stato osservato un aumento nella fosforilazione dei residui serina 66/68 e serina 361, (Westfall et al., 2005). Recentemente è stato, inoltre, riportato il coinvolgimento delle chinasi ATM, CDK2 e p70s6K nella fosforilazione di DeltaNp63 α in seguito a trattamento con Cisplatino (Huang et al., 2008).

Ciò che emerge da numerosi studi è che un difetto nei meccanismi che regolano negativamente l'espressione di DeltaNp63 α in risposta al danno al DNA potrebbero essere responsabili di una mancata risposta ai chemioterapici utilizzati nel trattamento dei tumori che mostrano alti livelli di questa proteina, come i carcinomi a cellule squamose (Zangen et al., 2005; King and Weinberg, 2007).

SCOPO DEL LAVORO

HIPK2 è una serina treonina chinasi identificata inizialmente per la sua interazione con i fattori di trascrizione omeodominio. Sia noi che altri gruppi di ricerca abbiamo dimostrato precedentemente che HIPK2 è coinvolta nell'apoptosi indotta dai raggi UV e dipendente da p53 grazie alla fosforilazione selettiva di questo oncosoppressore sul residuo serina 46. Dal momento che p53 ha un ruolo chiave per la sensibilità delle cellule tumorali ai farmaci antineoplastici, il primo obiettivo di questa tesi è stato indagare se anche il suo attivatore pro-apoptotico, HIPK2, fosse coinvolto in questo tipo di risposta.

Dopo aver dimostrato che HIPK2 media la sensibilità delle cellule tumorali ai farmaci chemioterapici in maniera sia dipendente che indipendente da p53, l'obiettivo successivo è stato approfondire lo studio dei meccanismi che non coinvolgono p53, identificando nuovi bersagli molecolari di HIPK2 nella risposta allo stress genotossico.

L'oncogene DeltaNp63 α è un membro della famiglia p53, che agisce come fattore di trascrizione con effetti di dominante negativo nei confronti di p53. In risposta al danno al DNA DeltaNp63 α è fosforilato e indirizzato alla degradazione attraverso il proteasoma. Dal momento che HIPK2 lega tutti i membri della famiglia p53, ci siamo chiesti se l'interazione HIPK2/p63 avesse un ruolo funzionale nella risposta cellulare allo stress genotossico. In particolare, attraverso esperimenti di iperespressione, RNAi e studi biochimici, abbiamo valutato la possibilità che DeltaNp63 α fosse un bersaglio diretto di HIPK2 in seguito a trattamento con i farmaci antineoplastici.

RISULTATI

La chinasi HIPK2 è coinvolta nella risposta cellulare ai farmaci antineoplastici

La serina treonina chinasi HIPK2 è coinvolta in numerosi processi cellulari, quali regolazione trascrizionale, proliferazione, sviluppo embrionale e danno al DNA, grazie all'interazione con un numero crescente di proteine. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato il ruolo di HIPK2 come attivatore dell'apoptosi in risposta a danno genotossico grave, grazie alla fosforilazione selettiva di p53 nel residuo serina 46 (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Di Stefano et al., 2004a; Dauth et al., 2007) e la conseguente attivazione dei geni pro-apoptotici target di p53 (Mayo et al., 2005). Dal momento che p53 ha un ruolo cruciale per la sensibilità delle cellule tumorali alle radiazioni ionizzanti e ai farmaci antineoplastici, ci siamo chiesti se anche il suo attivatore, HIPK2, fosse coinvolto in questo tipo di risposta. A tal fine abbiamo trattato la linea di cellule tumorali del colon RKO, che esprimono la proteina p53 nativa, con dosi letali di farmaci antitumorali quali Adriamicina, Etoposide o Bleomicina; inoltre, le cellule sono state trattate con i raggi ultravioletti, già noti attivare HIPK2 e la sua funzione di chinasi su p53 (Hofmann et al., 2002; D'Orazi et al., 2002). L'analisi mediante Western blot ha mostrato un aumento progressivo dei livelli proteici di HIPK2, a partire da quattro ore dopo il trattamento con tutti i farmaci utilizzati, confermando l'attivazione di questa proteina in seguito al danno al DNA (figura 6).

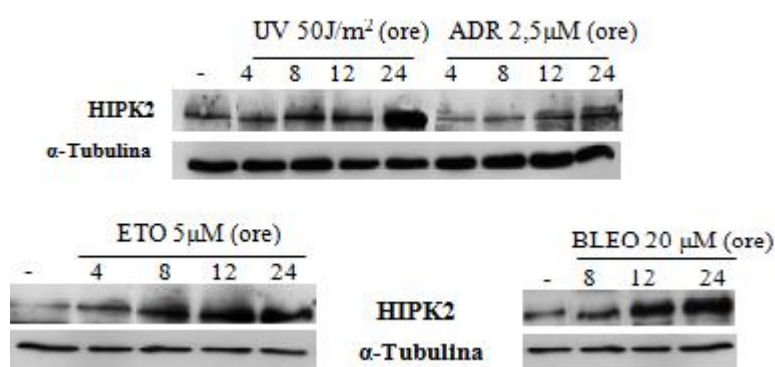


Figura 6 – Il trattamento con dosi letali di farmaci antineoplastici stabilizza la proteina HIPK2.

Le cellule RKO sono state trattate con raggi ultravioletti (UV), Adriamicina (ADR), Etoposide (ETO), Bleomicina (BLEO) alle dosi e ai tempi indicati oppure lasciate crescere in assenza di farmaci per 24 ore (-). 40 μ g di estratto proteico totale proveniente da ogni campione sono stati risolti mediante SDS PAGE e analizzati per l'espressione di HIPK2 mediante western blot. L'espressione della α -tubulina mostra quantità uguali di campioni caricati.

Per verificare l'effettivo coinvolgimento di HIPK2 nell'apoptosi dipendente da p53 e indotta dagli agenti antineoplastici, abbiamo effettuato saggi di clonogenicità in una linea cellulare depletata di HIPK2 (RKO-HIPK2i). Tale linea era stata precedentemente generata nel nostro laboratorio, a partire dalle RKO, mediante trasfezione stabile di uno *short hairpin* RNA diretto contro HIPK2; in questi esperimenti abbiamo, inoltre, utilizzato una linea di RKO di controllo, trasfettate in maniera stabile con il vettore vuoto (RKO-pSuper) (Di Stefano et al., 2004a) (Figura 7a). Le RKO-pSuper e le RKO-HIPK2i sono state trattate con UV, Adriamicina, Etoposide o Bleomicina per 24 ore, successivamente piastrate a bassa densità e lasciate crescere per una settimana in assenza di farmaci. I risultati ottenuti indicano che la deplezione di HIPK2 mediante RNAi conferisce alle cellule una maggiore resistenza al trattamento con i farmaci: infatti, le RKO-HIPK2i hanno mostrato un recupero della capacità di formare colonie, rispetto alla popolazione di controllo, in seguito al trattamento sia con UV (confermando dati ottenuti precedentemente nel nostro laboratorio) che con Adriamicina, Etoposide o Bleomicina (Figura 7b).

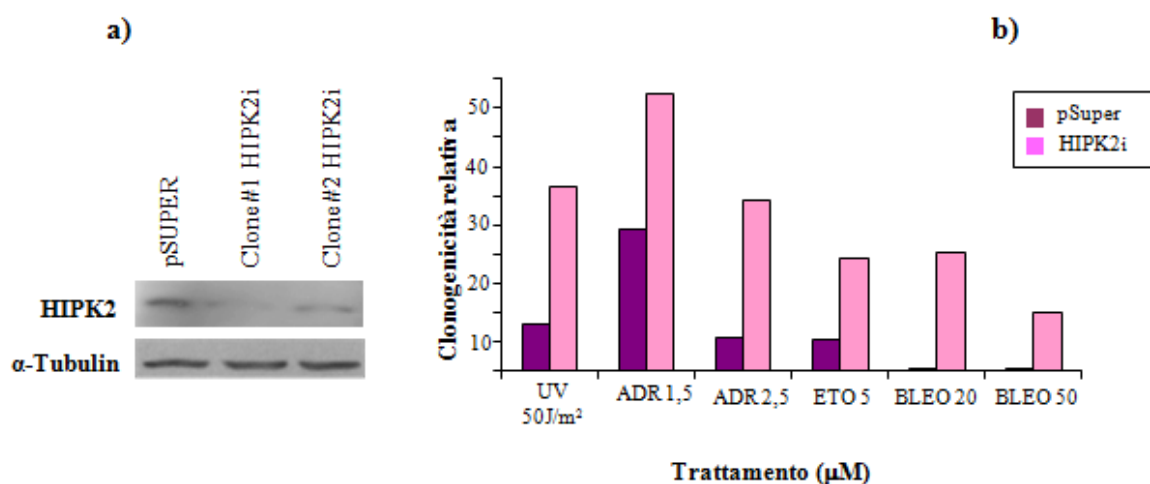


Figura 7 – La deplezione di HIPK2 mediante RNAi conferisce alle cellule una maggiore resistenza al trattamento con i farmaci chemioterapici.

Le cellule RKO sono state interferite in maniera stabile per la funzione di HIPK2 mediante RNAi (HIPK2i) o trasfettate con un vettore di controllo (pSuper).

a) La deplezione di HIPK2 è stata verificata mediante analisi di western blot. E' riportata l'analisi relativa a due popolazioni monoclonali di cellule interferite per la funzione di HIPK2 (#1 e #2)

b) Le cellule interferite (e la popolazione di controllo) sono state trattate con i farmaci indicati ed è stato effettuato il saggio di clonogenicità 24 ore dopo il trattamento. La clonogenicità relativa è stata calcolata come percentuale di colonie formate dalle cellule trattate con le droghe, rispetto alle colonie formate dalle cellule non trattate. Ogni campione è stato analizzato in duplicato e sono riportati i dati relativi ad un esperimento rappresentativo.

Considerando che HIPK2 è coinvolta anche nell'apoptosi indipendente da p53 (Hofmann et al., 2003; Zhang et al., 2003; Wang et al., 2006), abbiamo effettuato esperimenti analoghi a quelli appena descritti in un contesto privo di p53: abbiamo utilizzato, in un primo momento, la linea cellulare H1299, derivante da un tumore polmonare e nulla per l'espressione di p53 (p53^{-/-}). Anche in questo sistema sperimentale, abbiamo osservato un incremento dei livelli proteici di HIPK2 in seguito al trattamento con Adriamicina, Etoposide o Bleomicina, in maniera dipendente dalla dose (Figura 8a) e una maggiore resistenza a tutti i farmaci utilizzati nelle cellule H1299 interferite stabilmente per HIPK2 (H1299-HIPK2i), rispetto alla popolazione di controllo (H1299-pSuper) (Figura 8b-c). Questi risultati suggeriscono che HIPK2 abbia un ruolo chiave nella risposta agli agenti antineoplastici e che media la sensibilità ai farmaci attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti da p53.

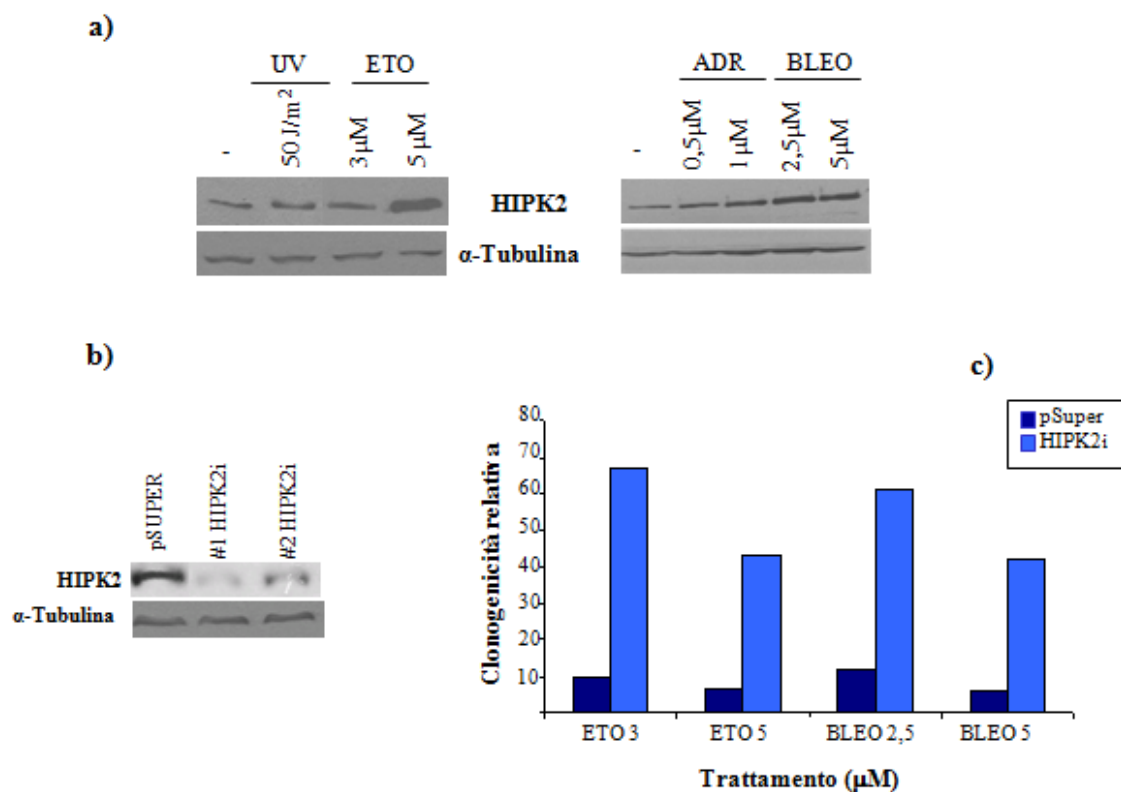


Figura 8 – HIPK2 è coinvolta nella risposta delle cellule tumorali prive di p53 ai farmaci antineoplastici.

a) Analisi mediante western blot dei livelli di espressione di HIPK2 in lisati cellulari totali preparati da cellule H1299, trattate con dosi letali dei farmaci indicati, o lasciate crescere in assenza di droghe, per 12 ore. La α -tubulina indica quantità uguali di campioni caricati.

Le cellule H1299 sono state interferite in maniera stabile per la funzione di HIPK2.

b) La deplezione di HIPK2 è stata verificata mediante western blot. E' riportata l'analisi relativa a due popolazioni monoclonali di cellule interferite per la funzione di HIPK2.

c) Saggio di clonogenicità effettuato dopo 24 ore di trattamento con i farmaci alle dosi indicate. La clonogenicità relativa è stata calcolata come in figura 7b. Ogni campione è stato analizzato in duplicato e sono riportati i dati relativi ad un esperimento rappresentativo.

Per confermare, in un sistema isogenico, quanto osservato finora, abbiamo utilizzato la linea di cellule tumorali del colon HCT116, che esprimono p53 nativa e la linea priva di p53, da esse derivata per ricombinazione omologa somatica (HCT116 p53^{-/-}) (Bunz et al.,1998): tali cellule sono state interferite in maniera transitoria con siRNA specifici per HIPK2 (HCT116-siHIPK2) o con siRNA di controllo (HCT116-siCTR) (Figura 9a) e sottoposte a saggio di clonogenicità dopo un trattamento di 24 ore con Adriamicina, alla dose letale di 2 μ M (Rinaldo et al., 2007a). Come atteso, le HCT116 parentali depletate di HIPK2 mostrano una maggiore capacità di formare colonie in seguito al trattamento con Adriamicina, rispetto alla popolazione di controllo; un comportamento analogo si riscontra anche nelle HCT116 p53^{-/-}, nelle quali la resistenza all'Adriamicina in assenza di HIPK2 risulta perfino potenziata (Figura 9b), confermando che HIPK2 media la risposta ai farmaci antineoplastici attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti da p53. I nostri studi successivi si sono focalizzati sui meccanismi indipendenti da p53 attraverso i quali HIPK2 media la sensibilità cellulare agli agenti antineoplastici.

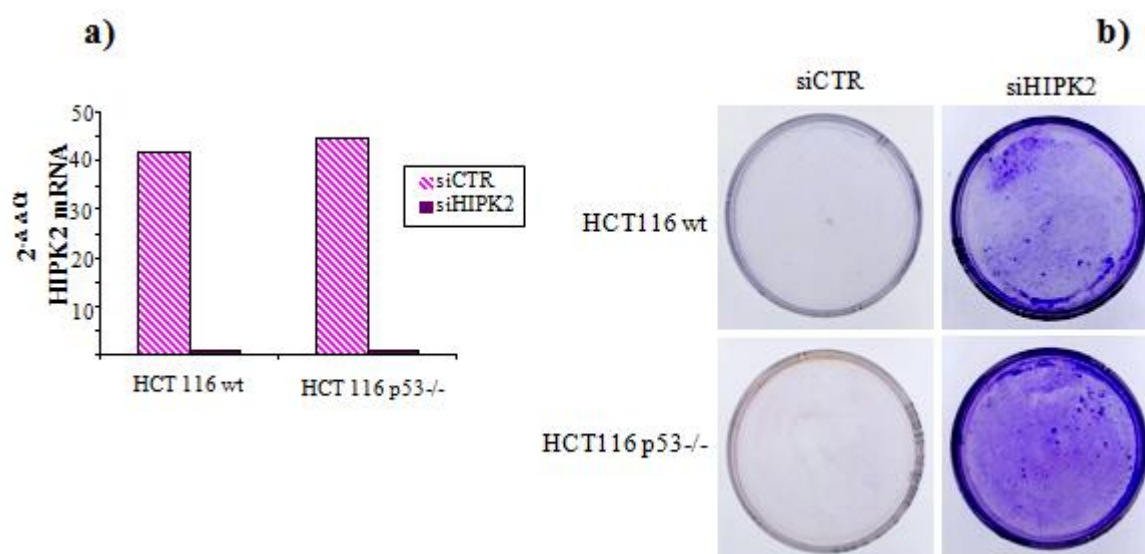


Figura 9 – HIPK2 media la sensibilità ai farmaci antineoplastici attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti da p53.

Le cellule HCT116 parentali (WT) o prive di p53 (p53^{-/-}) sono state trasdotte con RNA duplex Stealth (siHIPK2) o con i relativi controlli negativi universali (siCTR).

a) L'interferenza di HIPK2 è stata verificata mediante PCR *Real-time*, 48 ore dopo la trasfezione degli Stealth; i livelli di mRNA di HIPK2 sono stati normalizzati rispetto al RNA della GAPDH.

b) Saggio di clonogenicità effettuato 24 ore dopo il trattamento delle HCT116 WT o p53^{-/-}, depletate o meno di HIPK2, con Adriamicina 2 μ M.

HIPK2 media la degradazione di DeltaNp63 α in risposta all'Adriamicina

È stato dimostrato che HIPK2 interagisce, sia in vitro che in vivo, con gli altri membri della famiglia p53, p73 e p63 (Kim et al., 2002); è noto, inoltre, che l'isoforma DeltaNp63 α agisce da dominante negativo nei confronti di p53 (Wesfall et al., 2003; King et al., 2003) e che, in seguito a stress genotossico, è fosforilata ad opera di chinasi perlopiù sconosciute e degradata via proteasoma (Fomenkov et al., 2004; Rossi et al., 2004; Westfall et al., 2005; Zangen et al., 2005). Ci siamo chiesti, quindi, se l'interazione HIPK2/p63 avesse un ruolo funzionale nella risposta ai farmaci antineoplastici.

Dal momento che i sistemi cellulari utilizzati negli esperimenti precedenti non presentano livelli di p63 facilmente rilevabili con gli anticorpi a disposizione, abbiamo scelto un diverso pannello di cellule che esprimono livelli più alti, e quindi rilevabili mediante western blot, di DeltaNp63 α endogena. In particolare abbiamo utilizzato una linea di cellule epiteliali mammarie immortalizzate (MCF10-A) (Ciardiello et al., 1990), che esprimono p53 nativa, una linea di cheratinociti immortalizzati (HaCat) e una di carcinoma a cellule squamose (FaDu), che esprimono entrambe una forma mutata di p53 (Paramio et al., 2000; Min et al., 1994). Abbiamo verificato che in queste linee cellulari la risposta al danno al DNA fosse analoga a quanto osservato nelle RKO: come atteso, il trattamento con dosi letali di Adriamicina, induce un aumento dei livelli proteici di p53 nativa, ma non di quella mutata che, a causa della lunga emivita delle forme mutate, sono già molto alti a livello basale (Greenblatt et al., 1994). In tutti i casi, tuttavia, si osserva una stabilizzazione della proteina HIPK2 (Figura 10a), indicando una sua attivazione nella risposta apoptotica ai farmaci antineoplastici, anche in questi sistemi sperimentali. In queste condizioni, i livelli proteici di DeltaNp63 α diminuiscono a partire da 24 ore dopo il trattamento, fino a scomparire tra le 48 e le 72 ore, in maniera indipendente dallo stato di p53, suggerendo una correlazione tra l'attivazione di HIPK2 e la degradazione di DeltaNp63 α in risposta all'Adriamicina (Figura 10b).

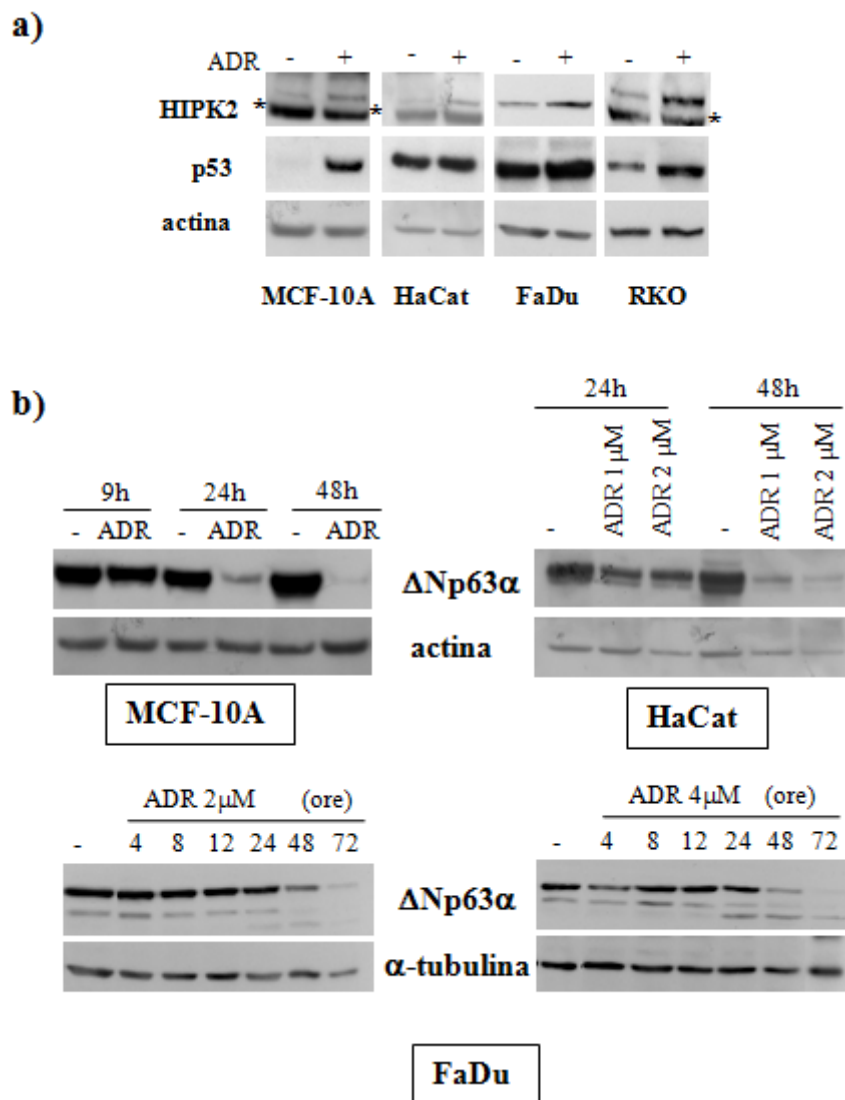


Figura 10 – L’attivazione di HIPK2 in risposta all’Adriamicina correla con la degradazione di DeltaNp63α.

a) Le cellule indicate sono state trattate con Adriamicina (ADR) alla dose 2μM o mantenute in assenza di farmaco (-). L’analisi mediante western blot delle proteine indicate è stata effettuata sugli estratti cellulari totali ottenuti dopo 12 ore di trattamento. L’asterisco (*) indica un segnale aspecifico.

b) I livelli proteici di DeltaNp63α (ΔNp63α) nelle cellule indicate sono stati analizzati mediante western blot dopo il trattamento con ADR alle dosi e ai tempi indicati. L’actina e l’α-tubulina sono state utilizzate come controllo di caricamento.

Per verificare che ci fosse un effetto causale di HIPK2 nella degradazione di DeltaNp63α, abbiamo trattato con Adriamicina le FaDu depletate di HIPK2 in maniera transitoria (FaDu siHIPK2) e abbiamo seguito la cinetica di degradazione di DeltaNp63α.

L'analisi mediante Western blot ha mostrato che l'interferenza di HIPK2 di per sè aumenta i livelli della proteina DeltaNp63 α . In seguito a trattamento con Adriamicina, nelle cellule interferite per HIPK2 i livelli di DeltaNp63 α restano costanti nel tempo, nonostante un'iniziale degradazione, al contrario di quanto avviene nella popolazione trasfettata con siRNA di controllo, in cui la proteina tende a scomparire quasi completamente dopo 48 ore di trattamento (Figura 11). Risultati simili sono stati ottenuti nelle cellule HaCat e MCF10-A (dati non mostrati); abbiamo concluso, quindi, che la deplezione di HIPK2 mediante siRNA recupera, almeno parzialmente, la degradazione di DeltaNp63 α indotta dall'Adriamicina.

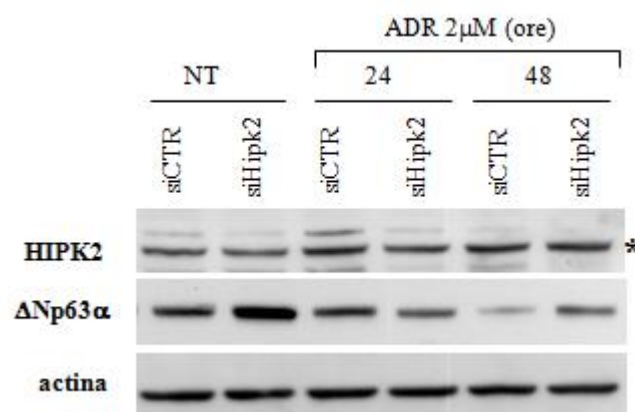


Figura 11 – L'interferenza di HIPK2 mediante siRNA recupera la degradazione di DeltaNp63 α in risposta all'Adriamicina.

Analisi mediante western blot dei livelli proteici di HIPK2 e di DeltaNp63 α . Gli estratti cellulari totali sono stati preparati da cellule FaDu trasdotte con gli RNA duplex Stealth e , 36 ore dopo la trasfezione, trattate con ADR 2 μ M, o mantenute in coltura in assenza di farmaco, per i tempi indicati. L'asterisco (*) indica un segnale aspecifico; l'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento.

Successivamente abbiamo analizzato l'effetto dell'espressione forzata di HIPK2 sui livelli proteici di DeltaNp63 α . Dal punto di vista funzionale, l'iperespressione di HIPK2 ricapitola l'apoptosi indotta dal danno al DNA, come il trattamento con Adriamicina (D'Orazi et al., 2002). Dosi crescenti di un vettore d'espressione che codifica la proteina chimerica green fluorescent protein-HIPK2 (EGFP-HIPK2) sono state trasfettate nelle cellule FaDu: i risultati ottenuti hanno mostrato una progressiva diminuzione dei livelli della proteina DeltaNp63 α endogena all'aumentare della quantità di EGFP-HIPK2 iperespressa, supportando un ruolo causale di HIPK2 nella degradazione di DeltaNp63 α (Figura 12a).

Come già descritto nella parte introduttiva di questa tesi, è noto che, in seguito a danno al DNA, DeltaNp63 α è indirizzata alla degradazione via proteasoma (Fomenkov et al., 2004; Westfall et al., 2005); la figura 12b mostra come il trattamento con l'inibitore del proteasoma MG132 prevenga la degradazione di DeltaNp63 α indotta dall'iperespressione di HIPK2, suggerendo che, in risposta all'Adriamicina, HIPK2 media la diminuzione dei livelli proteici di DeltaNp63 α favorendone la degradazione via proteasoma.

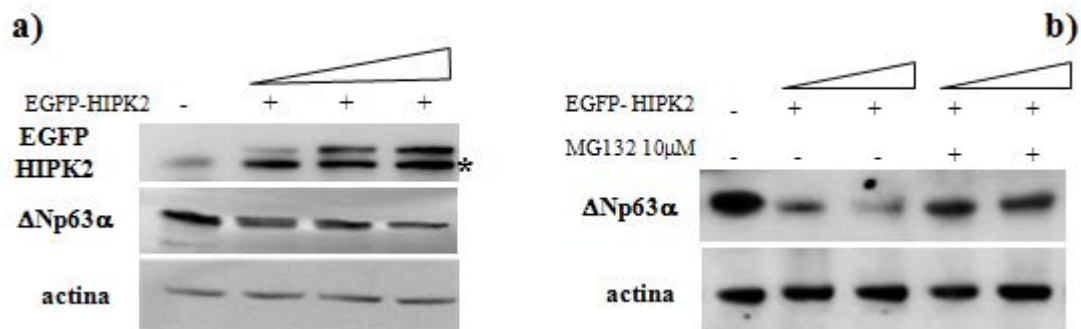


Figura 12 – L'iperespressione di HIPK2 induce la degradazione di DeltaNp63 α attraverso il proteasoma.

a) Le cellule FaDu sono state trasfettate con un vettore d'espressione che codifica la proteina chimerica EGFP-HIPK2 (0,5, 1, 2 μ g). I lisati cellulari totali sono stati preparati 36 ore dopo la trasfezione e analizzati mediante western blot per l'espressione di EGFP-HIPK2 e DeltaNp63 α endogena. L'asterisco (*) indica un segnale aspecifico.

b) Le cellule FaDu sono state trasfettate con EGFP-HIPK2 (1, 2 μ g) e, 20 ore dopo la trafezione, trattate con MG132 o il solvente (-) alla dose di 10 μ M. Gli estratti cellulari totali sono stati preparati dopo 10 ore di trattamento con MG132 e sono stati analizzati i livelli proteici di DeltaNp63 α endogena.

Il dominio carbossi-terminale di DeltaNp63 α è richiesto per la degradazione indotta dall'Adriamicina

Una volta dimostrata la dipendenza da HIPK2, abbiamo cercato di caratterizzare a livello biochimico la degradazione di DeltaNp63 α . In particolare, per individuare la regione responsabile della degradazione mediata da HIPK2, è stata testata la stabilità di alcuni mutanti di delezione di DeltaNp63 α in esperimenti di co-espressione con HIPK2, effettuati in collaborazione con il laboratorio di Luisa Guerrini (dati non mostrati). I risultati ottenuti hanno indicato che, a differenza di DeltaNp63 α nativa e degli altri costrutti testati, il mutante Delta390, che codifica una proteina trunca all'amminoacido 390 e mancante, quindi, di gran parte del dominio carbossi terminale, è resistente alla degradazione indotta dall'iperespressione di HIPK2 (Figura 13a). Abbiamo, quindi, analizzato il comportamento di questo mutante in seguito a trattamento con Adriamicina: le cellule FaDu, HaCat e H1299 sono state trasfettate con DeltaNp63 α nativa o con il mutante di delezione Delta390 e successivamente trattate con Adriamicina alla dose di 2 μ M. La figura 13b mostra la diminuzione dei livelli di DeltaNp63 α nativa a partire da 24 ore dopo il trattamento, fino ad arrivare alla quasi totale scomparsa dopo 48 ore, confermando il risultato ottenuto precedentemente per la proteina endogena. Al contrario, il mutante Delta390, maggiormente espresso già a livello basale, conserva la sua stabilità in seguito al trattamento con il farmaco mostrando, quindi, una sostanziale resistenza alla degradazione indotta dall'Adriamicina (Figura 13b).

Al fine di valutare il ruolo funzionale del dominio carbossi-terminale di DeltaNp63 α nell'apoptosi dipendente da HIPK2 e indotta dal danno al DNA, abbiamo effettuato un saggio di clonogenicità, dopo trattamento con Adriamicina, in cellule FaDu trasfettate con DeltaNp63 α nativa, con il mutante di delezione Delta390 o con il vettore di controllo. Nelle cellule che iperesprimono DeltaNp63 α nativa la capacità di formare colonie in seguito a trattamento con il farmaco è notevolmente ridotta rispetto alle cellule non trattate, in accordo con un'efficiente risposta apoptotica; al contrario, il mutante resistente alla degradazione mediata da HIPK2 recupera la capacità di formare colonie in seguito a trattamento con Adriamicina (Figura 14).

Questi risultati suggeriscono che il dominio carbossi-terminale di DeltaNp63 α è richiesto per la degradazione dipendente da HIPK2 e per la suscettibilità all'Adriamicina.

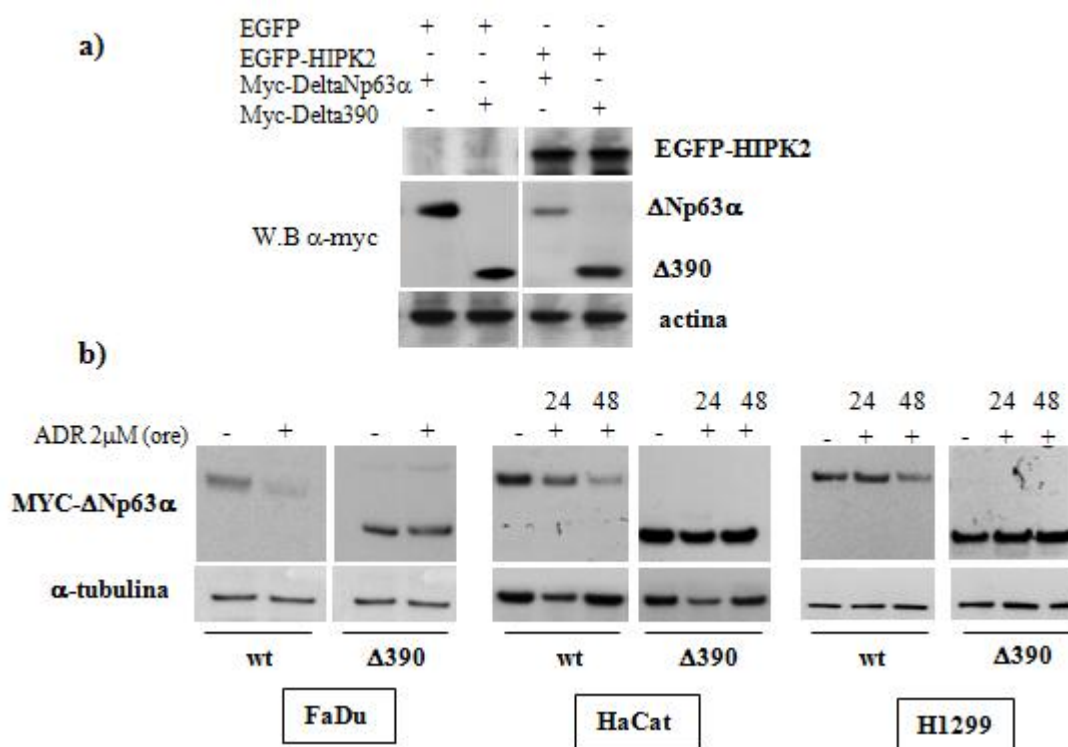


Figura 13 – Il dominio C-terminale di DeltaNp63 α è richiesto per la degradazione indotta dall’adriamicina e dipendente da HIPK2.

a) Le cellule FaDu sono state trasfettate con i vettori d’espressione che esprimono la proteina EGFP o la proteina di fusione EGFP-HIPK2 (2,5 μ g) insieme ad un vettore d’espressione che codifica la proteina Myc-DeltaNp63 α nativa o il suo mutante delecto del dominio C-terminale, Myc-Delta390 (Δ 390)(0,5 μ g). Gli estratti proteici totali sono stati preparati 24 ore dopo la trasfezione. L’analisi mediante western blot della proteina DeltaNp63 α esogena (Δ Np63 α) è stata effettuata con un anticorpo monoclonale anti-Myc .

b) Le cellule indicate sono state trasfettate con 0,5 μ g di un vettore d’espressione che codifica la proteina Myc-DeltaNp63 α nativa (WT) o il mutante di delezione Myc-Delta390 (Δ 390); dopo 16 ore dalla trasfezione sono state trattate con ADR per i tempi indicati e analizzate mediante western blot.

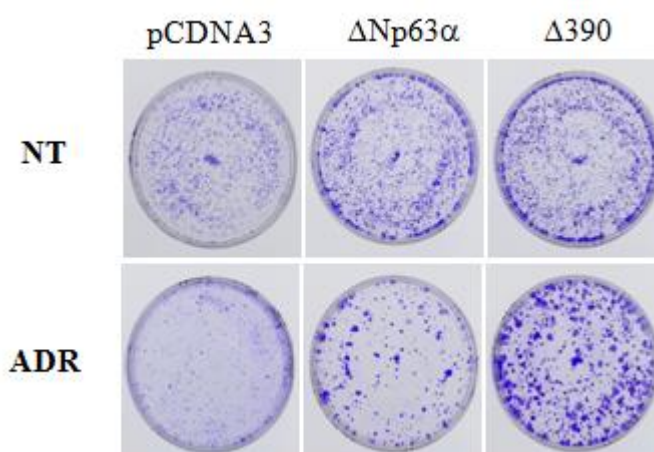


Figura 14 – Il mutante di DeltaNp63 α resistente alle degradazione mediata da HIPK2 recupera la capacità di formare colonie in seguito a trattamento con Adriamicina. Le cellule FaDu sono state trasfettate con 0,5 μ g dei vettori d’espressione indicati. 16 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con ADR 1 μ M o mantenute in assenza di farmaco (NT) per 24 ore ed è stato effettuato il saggio di clonogenicità.

La degradazione di DeltaNp63 α dipende dall'attività chinastica di HIPK2

Dal momento che HIPK2 media molte delle funzioni biologiche in cui è coinvolta attraverso la sua attività di serina/treonina chinasi, ci siamo chiesti se la fosforilazione fosse coinvolta anche nella degradazione di DeltaNp63 α .

In primo luogo abbiamo testato la possibilità di una fosforilazione diretta di p63 da parte di HIPK2. Le cellule H1299 sono state trasfettate con il vettore d'espressione eucariotico pcDNA3 che esprime HIPK2 o il mutante puntiforme HIPK2 (K221R), cataliticamente inattivo (Kim et al., 1998), fusi alla glutatione S-transferasi (GST) e sotto il controllo del promotore virale T7 (Imataka et al., 1998); prima della trasfezione le cellule erano state infettate con il Vaccinia virus al fine di ottenere maggiori quantità di espressione delle proteine esogene. Le proteine GST-HIPK2 e GST-K221R sono state purificate dai lisati cellulari mediante un GST *pull down* e utilizzate come fonte enzimatica in un saggio chinastico in vitro: quantità simili di GST-HIPK2 e GST-K221R sono state incubate con una proteina p63 ricombinante purificata (gentilmente fornita dal Prof. Roberto Mantovani) in presenza di [γ^{32} P]ATP. Come atteso, HIPK2 è in grado di autofosforilarsi (D'Orazi et al., 2002) e, inoltre, di fosforilare p63; la mancata attività chinastica del mutante puntiforme K221R, sia su se stesso che su p63, suggerisce che l'incorporazione di ^{32} P sia dovuta, in maniera specifica, a HIPK2 e non ad altre chinasi co-precipitate nel GST *pull down* (Figura 15).

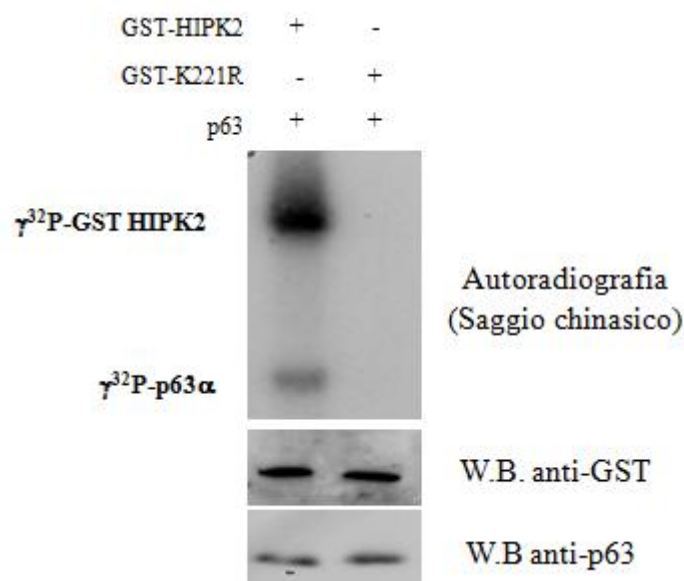


Figura 15 – HIPK2 fosforila p63 in vitro.

Le proteine GST-HIPK2 e GST-K221R sono state preparate mediante un *GST-pull down* dalle cellule H1299 e incubate con una proteina p63 purificata in presenza di [γ^{32} P]ATP. I prodotti della reazione chinasica sono stati risolti mediante SDS PAGE, e, dopo essere stato disidratato, il gel è stato sottoposto ad autoradiografia. L'analisi mediante western blot delle proteine GST e p63 è stata effettuata con gli anticorpi indicati, dopo reidratazione del gel.

Definita la fosforilazione diretta di p63 da parte di HIPK2 in vitro, abbiamo valutato il ruolo di tale attività chinasica nella degradazione di DeltaNp63 in vivo. In particolare abbiamo analizzato l'effetto del mutante puntiforme HIPK2(K221R) che, come detto, è cataliticamente inattivo, sulla stabilità di DeltaNp63 α . Come già descritto nella figura 12a, l'iperespressione di EGFP-HIPK2 induce la degradazione della proteina DeltaNp63 α endogena; l'iperespressione di dosi paragonabili di EGFP-HIPK2(K221R), al contrario, non altera i livelli proteici di DeltaNp63 α che mostra una stabilità analoga a quella osservata nelle cellule trasfettate con il vettore di controllo, suggerendo che l'attività chinasica di HIPK2 sia richiesta per la degradazione di DeltaNp63 α (Figura 16).

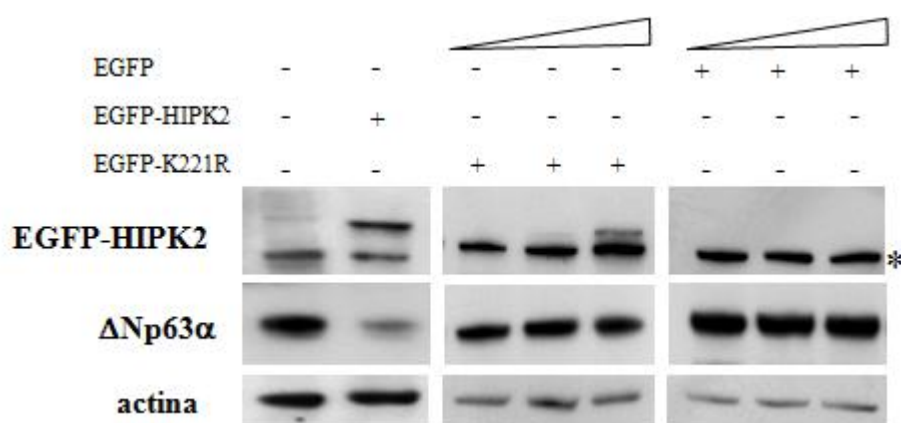


Figura 16 – La degradazione di DeltaNp63 α dipende dall'attività chinasica di HIPK2.

Le cellule FaDu sono state trasfettate con i vettori d'espressione EGFP, EGFP-K221R (2, 3, 5 μ g) o EGFP-HIPK2 (2,5 μ g). Gli estratti cellulari totali sono stati preparati 36 ore dopo la trasfezione per l'analisi mediante western blot delle proteine EGFP-HIPK2, EGFP-K221R e DeltaNp63 α endogena. L'asterisco (*) indica un segnale aspecifico.

HIPK2 fosforila il residuo Treonina 397 di DeltaNp63α

Stabilita la fosforilazione diretta di p63 da parte di HIPK2 e il ruolo di tale attività chinastica nella degradazione di DeltaNp63α, abbiamo cercato di identificare i siti di fosforilazione di HIPK2 su DeltaNp63α.

È noto che HIPK2 fosforila residui di serina e treonina preferenzialmente seguiti da prolina; negli esperimenti descritti sopra, abbiamo dimostrato che il dominio carbossi terminale di DeltaNp63α è richiesto per la degradazione dipendente da HIPK2 e indotta dall'Adriamicina: abbiamo, quindi, iniziato a cercare all'interno di questa regione i siti putativi di fosforilazione da parte di HIPK2. L'analisi della sequenza amminoacidica ha mostrato la presenza di 16 treonine e 20 serine nel dominio carbossi terminale di DeltaNp63α; di queste, solo le treonine 397, 444 e 524 e la serina 426 sono seguite da prolina e, quindi, probabili bersagli di HIPK2 (Figura 17).

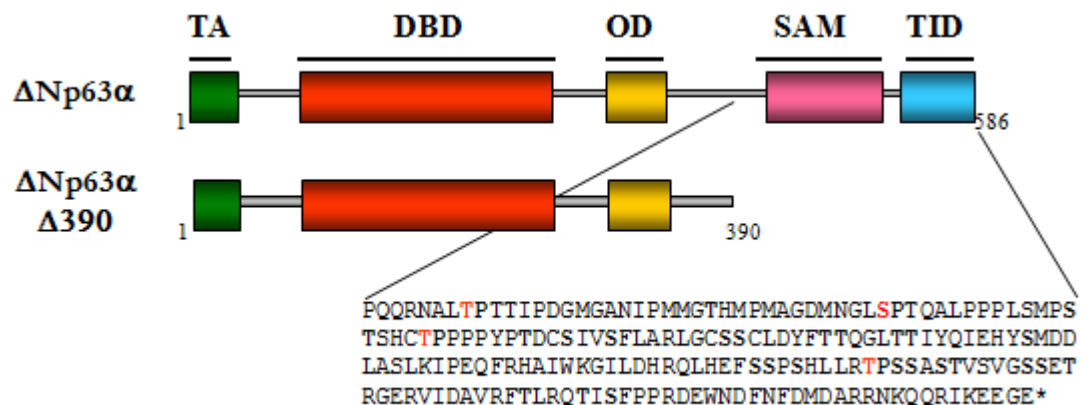


Figura 17 – Rappresentazione schematica della proteina DeltaNp63α e del mutante di delezione Delta390.

Sono indicati i diversi domini funzionali di DeltaNp63α: TA, dominio di transattivazione; DBD, dominio di legame al DNA; OD, dominio di oligomerizzazione; SAM: dominio *Sterile Alpha Motif*; TID: dominio di inibizione della transattivazione. I numeri rappresentano i residui amminoacidici. Il mutante Delta390 (Δ390) presenta un codone di stop all'amminoacido 390 e manca, quindi, di gran parte della regione C-terminale. E' riportata la sequenza amminoacidica dell'regione 390-586. I residui di serina e treonina sono evidenziati in grassetto; in rosso sono evidenziati i residui di serina o treonina seguiti da prolina, che costituiscono la sequenza consenso per HIPK2.

Disponendo di un vettore d'espressione che codifica un mutante puntiforme di DeltaNp63α, in cui il residuo Treonina 397 è stato mutato in Alanina (T397A) (gentilmente

fornitoci dalla Dott.ssa Luisa Guerrini), abbiamo incominciato la nostra analisi testando il comportamento di questo mutante in seguito all'iperespressione di HIPK2. Le cellule HaCat sono state trasfettate con DeltaNp63 α nativa o con DeltaNp63(T397A), soli o in presenza di EGFP-HIPK2. I risultati ottenuti hanno indicato che il mutante T397A è sostanzialmente resistente alla degradazione dipendente da HIPK2 (Figura 18a). La stabilità della proteina DeltaNp63(T397A) è stata testata, inoltre, in seguito al trattamento con dosi apoptotiche di Adriamicina: anche in questo caso, i livelli proteici del mutante puntiforme si mantengono costanti fino a 48 ore dopo il trattamento con il farmaco, a differenza di quanto osservato per la proteina DeltaNp63 α nativa (Figura 18b). Questi risultati suggeriscono che il residuo Treonina 397 di DeltaNp63 α sia richiesto per la degradazione dipendente da HIPK2 e indotta dall'Adriamicina.

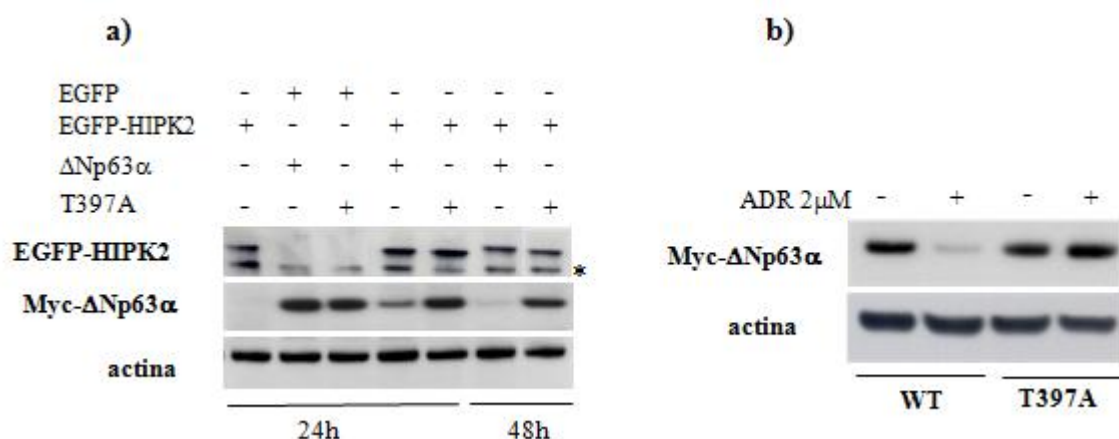


Figura 18 – Il residuo Treonina 397 di DeltaNp63 α è richiesto per la degradazione mediata da HIPK2 e indotta dall'Adriamicina.

a) Le cellule HaCat sono state trasfettate con i vettori d'espressione EGFP o EGFP-HIPK2(2,5μg) e Myc-DeltaNp63 α o Myc-T397A (0,5μg). Gli estratti cellulari totali sono stati preparati 24 e 48 ore dopo la trasfezione per l'analisi mediante western blot delle proteine indicate. L'asterisco (*) indica un segnale aspecifico.

b) Le cellule FaDu sono state trasfettate con 0,5 μg dei vettori d'espressione Myc-DeltaNp63 α nativa (WT) o con il suo mutante puntiforme Myc-T397A (T397A). L'Adriamicina è stata aggiunta 16 ore dopo la trasfezione, e gli estratti cellulari totali sono stati preparati dopo 48 ore di trattamento e analizzati mediante western blot.

Per verificare che il residuo Treonina 397 fosse bersaglio diretto di fosforilazione da parte di HIPK2 abbiamo effettuato un saggio chinamico in vitro. A tal fine, il cDNA di DeltaNp63 α e

quello di DeltaNp63(T397A) sono stati clonati nel vettore d'espressione batterico pGEX, in modo da creare proteine chimeriche, fuse con la GST. Quantità paragonabili di GST-DeltaNp63 α e GST-DeltaNp63(T397A), purificate da batteri (Figura 19a), sono state incubate con una proteina HIPK2 commerciale, (che consiste del solo dominio chinasi di HIPK2 ed è, quindi, cataliticamente attiva), in presenza di [γ^{32}]ATP. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la mutazione nel residuo T397 compromette l'incorporazione di γ^{32} P, suggerendo una fosforilazione diretta di questo sito da parte di HIPK2 (Figura 19b).

Nel loro insieme i risultati descritti suggeriscono che HIPK2 fosforila DeltaNp63 α sul residuo treonina 397 e che questa fosforilazione è richiesta per la degradazione indotta dall'Adriamicina.

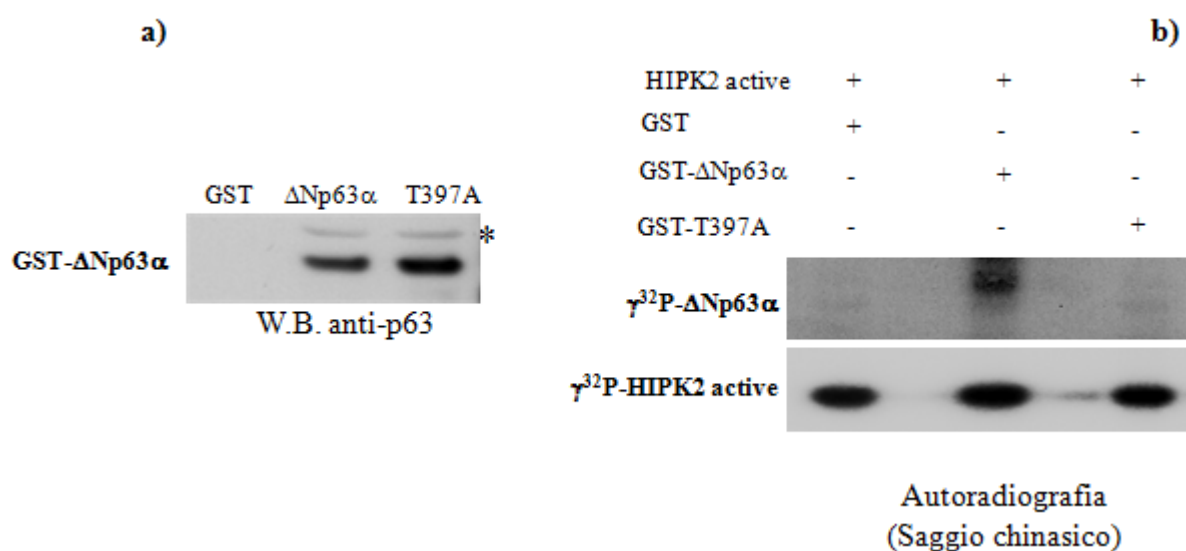


Figura 19 – HIPK2 fosforila il residuo T397A di DeltaNp63 α in vitro.

a) Le proteine GST, GST-DeltaNp63 α e GST-DeltaNp63-T397A, prodotte in batteri e purificate mediante *GST-pull down*, sono state analizzate mediante SDS PAGE e western blot anti-GST per stimare la quantità di proteine da utilizzare nel saggio chinasi.

b) Quantità paragonabili delle proteine di fusione GST indicate sono state incubate con 100 ng di HIPK2 *active* (UPSTATE) in presenza di [γ^{32}]ATP. I prodotti della reazione chinasi sono stati risolti mediante SDS PAGE e il gel disidratato è stato sottoposto ad autoradiografia.

DISCUSSIONE

L'oncosoppressore p53, oltre ad avere un ruolo chiave per il mantenimento della stabilità genomica e, quindi, per la prevenzione dello sviluppo di tumori, è considerato un fattore fondamentale per un'efficiente risposta alle terapie contro il cancro. La maggior parte dei farmaci chemioterapici utilizzati in clinica, infatti, agisce inducendo danno al DNA e attivando nelle cellule tumorali l'apoptosi mediata da p53. La delucidazione dei meccanismi molecolari che mediano le funzioni di p53 in seguito a stress genotossico potrebbe essere fondamentale, quindi, per migliorare le terapie antineoplastiche soprattutto nei tumori che, a causa della perdita della funzione di p53, sviluppano chemio-resistenza.

La serina treonina chinasi HIPK2 è coinvolta in molteplici processi cellulari quali regolazione trascrizionale, sviluppo embrionale, differenziamento, proliferazione e apoptosi, grazie all'interazione con un numero crescente di proteine (Rinaldo et al., 2007b). In particolare, sia noi che altri gruppi di ricerca abbiamo caratterizzato il ruolo centrale di questa proteina nell'attivazione dell'oncosoppressore p53 in senso apoptotico: in risposta a danno grave al DNA, infatti, HIPK2 è una delle chinasi responsabili della fosforilazione del residuo serina 46 di p53 (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002), evento chiave per l'attivazione irreversibile del programma apoptotico nelle cellule danneggiate (Oda et al., 2000).

Data l'importanza della funzione di p53 per la sensibilità delle cellule tumorali ai farmaci antineoplastici, abbiamo valutato il ruolo del suo attivatore apoptotico, HIPK2, in questo tipo di risposta.

I risultati descritti in questa tesi mostrano come HIPK2 sia coinvolto nella risposta a diversi farmaci antineoplastici. Infatti, in seguito al trattamento con dosi apoptotiche di Adriamicina, Etoposide o Bleomicina (oltre che raggi UV) abbiamo osservato un accumulo della proteina HIPK2, mentre la sua deplezione mediante RNAi determina una maggiore resistenza delle cellule all'apoptosi indotta dai farmaci. Sebbene i meccanismi di attivazione di HIPK2 non siano ancora noti, l'aumento dei suoi livelli proteici in seguito a stress genotossico è stato precedentemente descritto e correla con una maggiore fosforilazione di p53 in serina 46 (Rinaldo et al., 2007; Dauth et al., 2007; Di Stefano et al., 2004; Gresko et al., 2006): nei tumori che esprimono una proteina p53 funzionante, quindi, l'attivazione di HIPK2 dovrebbe potenziare l'apoptosi in risposta ai farmaci. In uno studio recente, infatti, Puca e collaboratori hanno

mostrato come l'iperespressione di HIPK2 aumenti la sensibilità di cellule di tumore ovarico, che esprimono la p53 nativa, al trattamento chemioterapico (Puca et al., 2008). Questo meccanismo spiegherebbe la resistenza ai farmaci che abbiamo riscontrato in seguito all'interferenza di HIPK2 nella linea tumorale di colon RKO, in cui è presente p53 nativa.

In accordo con il suo ruolo nell'attivazione dell'apoptosi indipendente da p53 (Hofmann et al., 2003; Zhang et al., 2003; Wang et al., 2006), abbiamo riscontrato il coinvolgimento di HIPK2 nella risposta ai farmaci antitumorali anche in assenza di questo oncosoppressore. Nella linea di carcinoma del polmone H1299, nulla per l'espressione di p53, infatti, abbiamo osservato non solo l'aumento dei livelli proteici di HIPK2 in seguito al trattamento con tutti i farmaci utilizzati, ma anche l'induzione di chemio-resistenza nelle cellule interferite per la sua funzione. I saggi di clonogenicità effettuati nel sistema isogenico della linea tumorale di colon HCT116, inoltre, hanno confermato che la deplezione di HIPK2 conferisce alle cellule una maggiore resistenza all'apoptosi indotta dall'Adriamicina e questo effetto risulta perfino più evidente in assenza di p53.

Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che HIPK2 media la sensibilità delle cellule tumorali ai farmaci antineoplastici attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti dalla sua azione su p53.

Tra le vie di segnalazione che non coinvolgono p53, abbiamo individuato un nuovo bersaglio molecolare di HIPK2 nella risposta allo stress genotossico, la proteina DeltaNp63 α .

In uno studio pubblicato nel 1998, Kim e collaboratori hanno riportato che HIPK2 interagisce non solo con p53, ma anche con gli altri membri della famiglia, p63 e p73 (Kim et al., 1998). Tra questi, l'isoforma DeltaNp63 α è considerata un oncogene, a causa del suo ruolo nella proliferazione, nella sopravvivenza e/o nell'inibizione dell'apoptosi (King and Weinberg, 2007), oltre che per la sua azione di dominante negativo nei confronti sia di p53 che delle isoforme TAp63 e TAp73 (Yang et al., 1998). In accordo con le sue proprietà antiapoptotiche, è stato dimostrato che in seguito a danno al DNA, quali raggi UV e trattamento con Cisplatino, DeltaNp63 α è fosforilata da chinasi non del tutto note e indirizzata alla degradazione via proteasoma (Fomenkow et al., 2004; Westfall et al., 2005).

I risultati riportati in questa tesi mostrano come l'interazione HIPK2/p63 abbia un ruolo funzionale nella risposta ai farmaci antineoplastici. Infatti, in linee cellulari che esprimono alti livelli di DeltaNp63 α endogena, siano esse normali o tumorali, l'accumulo e l'attivazione di HIPK2 in seguito al trattamento con dosi apoptotiche di Adriamicina correla con la diminuzione

dei livelli proteici di DeltaNp63 α , in maniera indipendente dallo stato di p53. Due evidenze qui riportate suggeriscono fortemente un ruolo causale di HIPK2 nella regolazione di DeltaNp63 α in risposta ai farmaci antineoplastici: l'interferenza transitoria di HIPK2 recupera la diminuzione della proteina DeltaNp63 α indotta dall'Adriamicina, mentre la sua iperespressione ne determina la degradazione via proteasoma, in maniera dipendente dalla quantità di HIPK2 iperespressa.

Sebbene la degradazione di DeltaNp63 α attraverso il proteasoma sia in accordo con quanto riportato in letteratura (Westfall et al., 2005), non possiamo escludere il parziale coinvolgimento di un controllo trascrizionale. È possibile, inoltre, che anche altri regolatori siano responsabili della modulazione dell'espressione di DeltaNp63 α in risposta al danno al DNA, dal momento che la deplezione di HIPK2 non porta ad un totale recupero dei suoi livelli proteici.

In maniera interessante, l'accumulo di DeltaNp63 α osservato in seguito alla sola interferenza di HIPK2, suggerisce che la chinasi potrebbe avere un ruolo nella regolazione di questa proteina anche in assenza di stimoli genotossici; tuttavia, al momento, non abbiamo ulteriori evidenze che confermino questa ipotesi.

Il ruolo delle modificazioni post-traduzionali, e in particolare della fosforilazione, nella risposta cellulare al danno al DNA è ormai noto (Appella and Anderson, 2001; Ashcroft et al., 2000). Le fosforilazioni di p53 all'estremità N-terminale ne inducono la stabilizzazione e l'attivazione in cellule esposte allo stress genotossico (Bode and Dong, 2004) e un meccanismo di attivazione simile è stato descritto anche per TAp73 (Oberst et al., 2005; Agami et al., 1999). Al contrario, le modificazioni all'estremità C-terminale inibiscono la capacità di p53 di regolare negativamente il legame sequenza-specifico al DNA, oltre a modularne la stabilità, lo stato di oligomerizzazione, il trasporto nucleo/citoplasma e il grado di ubiquitinazione (Chernov et al., 2001). Diversi studi hanno dimostrato che la fosforilazione è coinvolta anche nella modulazione negativa di DeltaNp63 α in seguito a stimoli genotossici (Fomenkov et al., 2004; Westfall et al., 2005; Huang et al., 2008); tuttavia, DeltaNp63 α manca del dominio N-terminale in cui è localizzata la maggior parte dei siti di fosforilazione di p53 e non presenta omologia di sequenza con la regione C-terminale di p53 in cui sono state mappate le fosforilazioni con funzione regolativa. Inoltre, come ampiamente descritto sopra, la fosforilazione di DeltaNp63 α in risposta al danno al DNA ha un ruolo inibitorio piuttosto che di attivazione, mediandone la degradazione via proteasoma (Fomenkov et al., 2004; Westfall et al., 2005). D'altra parte Zhang e collaboratori hanno già descritto un ruolo della fosforilazione mediata da HIPK2 nella regolazione negativa del fattore pro-apoptotico CtBP, la cui fosforilazione in serina 422, in

risposta a trattamento con raggi UV, ne causa la degradazione consentendo l'attivazione dell'apoptosi (Zhang et al., 2003).

I nostri dati evidenziano da un lato l'importanza del dominio carbossi-terminale di DeltaNp63 α , dall'altro il coinvolgimento della attività chinasi di HIPK2 nella degradazione indotta dall'Adriamicina. Infatti, HIPK2 è in grado di fosforilare p63 in vitro e l'iperespressione del suo mutante privo di attività chinasi non altera i livelli proteici di DeltaNp63 α .

Tra i potenziali siti di fosforilazione, ritenuti tali sulla base delle sequenza amminoacidica, in quanto consenso per HIPK2, abbiamo dimostrato che il residuo treonina 397, situato all'estremità C-terminale di DeltaNp63 α , è bersaglio diretto di fosforilazione da parte di HIPK2 e che tale fosforilazione è richiesta per la degradazione mediata da questa chinasi e indotta dall'Adriamicina.

Ulteriori studi andranno effettuati per verificare l'eventuale presenza di altri siti bersaglio di fosforilazione da parte di HIPK2 su DeltaNp63 α e analizzarne il ruolo biologico.

In un lavoro pubblicato recentemente, Huang e collaboratori hanno riportato la fosforilazione della treonina 397 ad opera della chinasi CDK2, in risposta al Cisplatino (Huang et al., 2008). È possibile che a seconda del contesto cellulare, nonché del tipo di stress genotossico presente, chinasi diverse possano essere coinvolte nella modificazione post-traduzionale del medesimo residuo. Ciò che emerge è sicuramente l'importanza di tale treonina nella modulazione della stabilità DeltaNp63 α in risposta al danno al DNA.

In sintesi, il nostro studio suggerisce che HIPK2 abbia un ruolo chiave nella risposta ai farmaci antineoplastici, mediando la sensibilità delle cellule tumorali ai chemioterapici attraverso meccanismi sia dipendenti che indipendenti da p53. In particolare, abbiamo individuato una nuova via di segnalazione secondo la quale l'attivazione di HIPK2 in seguito al trattamento con l'Adriamicina induce la fosforilazione diretta e specifica dell'oncogene DeltaNp63 α , sul residuo treonina 397, mediandone la degradazione via proteasoma e permettendo, in questo modo, la realizzazione del programma apoptotico (Figura 20).

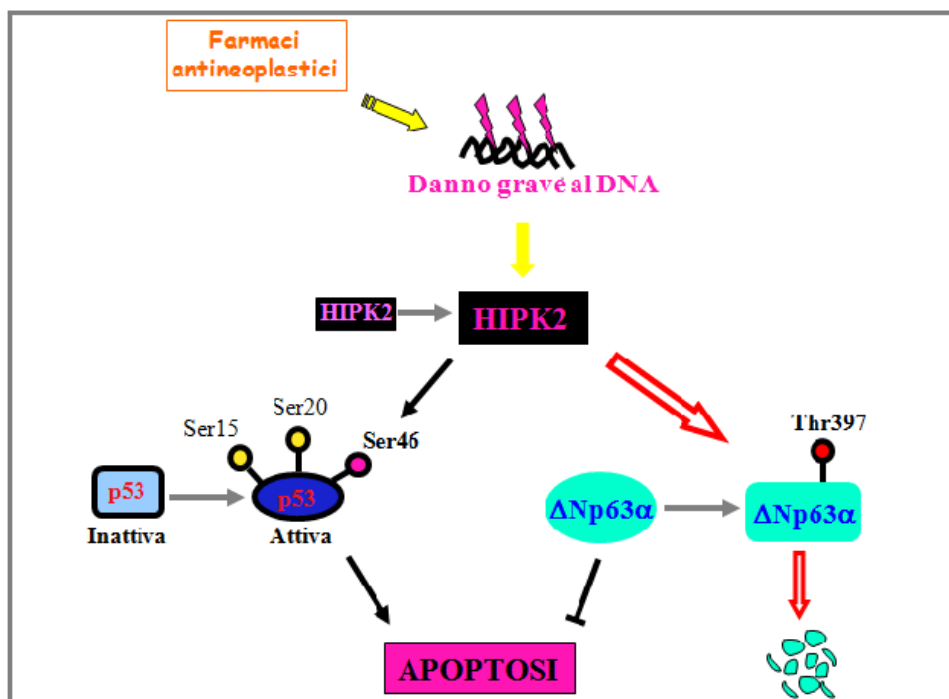


Figura 20 – Modello che riassume il ruolo di HIPK2 nella risposta ai farmaci antineoplastici

Il danno al DNA grave, indotto dai farmaci chemioterapici, porta alla stabilizzazione di HIPK2 e alla conseguente attivazione dell'apoptosi, sia grazie alla fosforilazione di p53 sul residuo serina 46 (a sinistra) sia attraverso meccanismi indipendenti da p53 stessa. Tra questi, abbiamo individuato la fosforilazione del residuo treonina 397 (Thr 397) di DeltaNp63α (ΔNp63α) che ne causa la degradazione attraverso la via del proteasoma (a destra)

In base a quanto detto finora, l'attivazione di HIPK2 potrebbe rivelarsi un bersaglio promettente per nuove strategie terapeutiche contro il cancro sia nei tumori che esprimono p53 nativa, per potenziare la risposta cellulare alle terapie convenzionali, sia in quelli in cui p53 è assente o la sua attività proapoptotica è bloccata, per esempio, a causa dell'iperespressione di DeltaNp63α (Zangen et al., 2005).

MATERIALI E METODI

Linee cellulari, condizioni di coltura e trattamento con i farmaci

Le cellule RKO, H1299, HCT116 (p53^{+/+} e p53^{-/-}, gentilmente forniteci da B. Vogelstein), FaDu e HaCat sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) arricchito con 10% di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS), 2mM di glutammina, 0.05 I.U./ml di penicillina e 0.05µg/ml di streptomina (Gibco). Le cellule mammarie immortalizzate MCF10-A sono state coltivate in MEBM (Mammary Epithelium Basal Medium) arricchito con elementi forniti direttamente dal produttore (MEGM SingleQuots, Clonetics), quali gentamicina, anfotericina-B, BPE (Bovine Pituitary Extract), idrocortisone, insulina ed EGF (Epidermal Growth Factor).

Per il danno al DNA, le cellule sono state piastrate al 40% di confluenza e, dopo 24 ore, trattate con raggi ultravioletti (UV), Adriamicina, Etoposide o Bleomicina alle dosi e per i tempi indicati.

L'inibitore del proteasoma MG132 è stato utilizzato alla concentrazione di 10µM per 10 ore.

Saggi di clonogenicità

Le cellule RKO e H1299, depletate o meno di HIPK2, sono state trattate per 24 ore con i farmaci alle dosi indicate, successivamente sono state piastrate 5×10^4 cellule in piastre da 60mm, in duplicato per ogni trattamento, e lasciate crescere per una settimana in assenza di farmaci, cambiando il terreno di coltura ogni tre giorni.

Le cellule HCT116, alla confluenza del 30%, sono state trattate con Adriamicina 2µM, a 48 ore dalla trasfezione con i siRNA (vedi oltre). Dopo 24 ore di trattamento, il farmaco è stato rimosso e le cellule sono state lasciate in coltura per una settimana.

Le cellule sono state colorate con il cristalvioletto (0.5% in metanolo) per 10 minuti e asciugate all'aria. Le colonie sono state contate al transilluminatore. La clonogenicità relativa è stata calcolata come segue:

$$\text{Clonogenicità Relativa (\%)} = \frac{\text{N° di colonie nelle cellule trattate con i farmaci}}{\text{N° di colonie nelle cellule non trattate}} \times 100$$

Vettori d'espressione e trasfezioni

I plasmidi pCDNA3-Myc- Δ Np63 α , pCDNA3-Myc-T397A e pCDNA3-Myc- Δ 390 sono stati forniti gentilmente dalla Dott.ssa Luisa Guerrini. I plasmidi pEGFP-C2 (Stratagene), pEGFP-HIPK2 e pEGFP-K221R sono stati descritti precedentemente (Cecchinelli et al., 2006a).

Tutti i vettori d'espressione utilizzati sono stati trasfettati nelle cellule mediante il sistema dei liposomi (Lipofectamine Plus, Gibco) secondo le istruzioni del produttore.

Per la costruzione dei vettori pGex- Δ Np63 α e pGex- Δ Np63(T397A) il cDNA di Δ Np63 α murina e del suo mutante puntiforme T397A sono stati amplificati per PCR dai relativi vettori pCDNA3-Myc in presenza dei seguenti oligonucleotidi di innesco

Δ Np63 BamH1 UPPER: 5' - CGATATGGATCCTTGTACCTGGAAAACAATGCCC – 3'

Δ Np63 Xho1 LOWER 5' – CGTATACTCGAGTCATTCTCCTTCCTCTTTGATACG – 3'

e clonati nel vettore pGex6p-2rbs in BamH1/ Xho1.

Interferenza mediata da RNA

I vettori pRetroSuper e pRetroSuper-HIPK2 (Cecchinelli et al., 2006a) sono stati trasfettati mediante Lipofectamine Plus (Gibco) nelle cellule RKO e H1299. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state coltivate in presenza di 2 μ g/ml di puromicina e sono stati selezionati cloni depletati di HIPK2 in maniera stabile.

Per l'interferenza transitoria di HIPK2 è stata utilizzata una miscela di tre differenti sequenze specifiche per HIPK2 (*HIPK2i Stealth RNAi sequences*) e un controllo negativo universale (*Stealth RNAi Negative medium GC Duplexes*) (Invitrogen). Le cellule HCT116 e FaDu sono

state trasfettate con tali siRNA, alla concentrazione di 40nM, mediante oligofectamina (RNAiMAX reagent, Invitrogen), secondo le istruzioni del produttore.

Estrazione dell' RNA e *Real time Reverse Transcription-PCR* (Real Time RT-PCR)

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il Trizol (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. Il cDNA è stato sintetizzato in un volume totale di 20µl, contenenti 200 ng di RNA totale, utilizzando il kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Per l'analisi di real time PCR è stata utilizzata la *SYBR Green DNA Master Mix* (Applied Biosystems) e il software SDS del sistema Applied Biosystems 7500. L'RNA della GAPDH è stato utilizzato per normalizzare la quantità di RNA totale presente in ogni campione. Gli oligonucleotidi di innesco impiegati sono i seguenti:

HIPK2 UPPER: 5'- AGGAAGAGTAAGCAGCACCAG- 3'

HIPK2 LOWER: 5'- TGCTGATGGTGATGACACTGA- 3'

GAPDH UPPER: 5'- TCCCTGAGCTGAACGGGAAAG- 3'

GAPDH LOWER: 5' – GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT- 3'

Ogni amplificazione è stata effettuata in duplicato su due differenti preparazioni di RNA.

Analisi mediante Western Blot

Le cellule sono state tripsinizzate, raccolte mediante centrifugazione a 1000 rpm per 5 minuti e lavate in PBS. Per l'estrazione delle proteine totali, il pellet cellulare è stato risospeso nel tampone di lisi [50mM Tris-HCl (pH 8), 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8), 0.5% Sodio Deossicolato, 0.1% sodio-dodecil solfato (SDS), 1% Nonidet P40, con l'aggiunta di una miscela di inibitori delle proteasi (Roche)] e incubato in ghiaccio per 20 minuti. Dopo una centrifugazione di 20 minuti a 14000 rpm, il supernatante è stato quantificato allo spettrofotometro mediante saggio Bradford (Coomassie Blue in soluzione acida).

Gli estratti cellulari totali sono stati risolti mediante SDS-PAGE su gel gradientati preconfezionati NuPAGE 4-12% (Invitrogen), trasferiti elettricamente su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad) e analizzati mediante Western Blotting con i seguenti anticorpi: policlonale di coniglio anti-HIPK2 (fornito gentilmente dal Dott. M.L. Schmitz); monoclonale di topo anti-Myc (Upstate); monoclonale di topo anti-p63 4A4 (Santa Cruz); policlonale di coniglio anti-p53 FL393 (Santa Cruz); policlonale di coniglio anti-GST (gentilmente fornito dal Dott. Maurizio Fanciulli); monoclonale di topo anti-actina (Sigma); antisiero secondario di capra anti-IgG di topo e anti-IgG di coniglio coniugati con l'enzima perossidasi di rafano (Cappel). L'immunoreattività è stata determinata utilizzando la reazione di chemiluminescenza *ECL Western Blotting Detection* (ECL, Enhanced-Chemiluminescence, Amersham), secondo le istruzioni del produttore e successiva autoradiografia.

Saggi di *pull down* in vitro

Le cellule H1299 sono state infettate con il Vaccinia virus e successivamente trasfettate (con il metodo Lipofectamine Plus, Invitrogen) con un vettore d'espressione eucariotico pcDNA3-GST(HIPK2) o pcDNA3-GST(K221R), che codificano rispettivamente il cDNA di HIPK2 o del mutante K221R sotto il controllo del promotore virale T7 (Imataka et al., 1998). Dopo 20 ore dalla trasfezione/infezione le cellule sono state tripsinizzate e i pellet cellulari sospesi nel tampone di lisi [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA, 300mM NaCl, 150mM KCl, 1mM DTT, 1% Nonidet P40 e una miscela di inibitori delle proteasi (Roche)] (D'Orazi et al., 2002).

Le proteine ricombinanti GST- Δ Np63 α e GST- Δ Np63(T397A) sono state prodotte nei batteri BL-21, come già descritto (D'Orazi et al., 2002).

In entrambi i casi, le proteine di fusione GST sono state isolate dagli estratti cellulari totali mediante incubazione con la resina glutatione sefarosio (Pharmacia).

Saggi chinasici in vitro

I saggi chinasici sono stati effettuati utilizzando come fonte enzimatica la proteina ricombinante GST-HIPK2 prodotta in cellule di mammifero (come descritto sopra) oppure la proteina ricombinante *HIPK2 active*, che consiste del solo dominio chinasico, prodotta in cellule di insetto (Upstate).

GST-HIPK2 o GST-K221R sono state incubate insieme a 500 ng di una proteina ricombinante p63 (gentilmente fornitaci dal Dott. Roberto Mantovani) in 25 µl finali di soluzione per la reazione chinasica (20mM Hepes, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 5 µCi [γ-³²P]ATP). 100 ng di *HIPK2 active* sono stati incubati con le proteine GST, GST-ΔNp63α o GST-ΔNp63(T397A), in 25 µl della miscela di reazione descritta sopra.

La reazione è stata effettuata a 30° per 30 minuti. I prodotti di reazione sono stati risolti mediante SDS-PAGE su gel gradientato NuPAGE 4-12% (Invitrogen) e le proteine marcate con ³²P sono state rilevate mediante autoradiografia dopo disidratazione del gel.

BIBLIOGRAFIA

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.*, **15**: 2177-2196 (2001).

Al-Beiti MA, Lu X. Expression of HIPK2 in cervical cancer: correlation with clinicopathology and prognosis. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gyneacol.*, **48**: 329-336 (2008).

Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*, **399**: 734-737 (1999).

Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.*, **268**: 2764-2772 (2001).

Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol.*, **20**: 3224-3233 (2000).

Bakkers J, Hild M, Kramer C, Furutani-Seiki M, Hammerschmidt M. Zebrafish DeltaNp63 is a direct Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell.*, **2**: 617-627 (2002).

Barbieri CE, Barton CE, Pietenpol JA. DeltaNp63 alpha expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem.*, **278**: 51408-51414 (2003).

Barbieri CE, Perez CA, Johnson KN, Ely KA, Billheimer D, Pietenpol JA. IGFBP-3 is a direct target of transcriptional regulation by DeltaNp63alpha in squamous epithelium. *Cancer Res.*, **65**: 2314-2320 (2005).

Bartkova J, Rezaei N, Lontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoint. *Nature*, **444**: 633-637 (2006)

Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**: 864-870 (2005)

Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**: 738-747 (2001).

Bénard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC. TP53 family members and human cancers. *Hum. Mutat.*, **21**: 182-191 (2003).

Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**: 793-805 (2004).

Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.*, **19**: 2122-2137 (2005).

Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.*, **18**: 6845-6854 (1999).

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**:1497-1501 (1998).

Calzado MA, Renner F, Roscic A, Schmitz ML. HIPK2: a versatile switchboard regulating the transcription machinery and cell death. *Cell Cycle.*, **6**:139-143 (2007).

Calzado MA, de la Vega L, Möller A, Bowtell DD, Schmitz ML. An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response. *Nat. Cell Biol.*, **11**: 85-91 (2009).

Cecchinelli B, Porrello A, Lazzari C, Gradi A, Bossi G, D'Angelo M, Sacchi A, Soddu S. Ser58 of mouse p53 is the homologue of human Ser46 and is phosphorylated by HIPK2 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **13**: 1994-1997 (2006a).

Cecchinelli B, Lavra L, Rinaldo C, Iacovelli S, Gurtner A, Gasbarri A, Olivieri A, Del Prete F, Trovato M, Piaggio G, Bartolazzi A, Soddu S, Sciacchitano S. Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is requisite for p53-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.*, **26**: 4746-4757 (2006b).

Chernov MV, Bean LJ, Lerner N, Stark GR. Regulation of ubiquitination and degradation of p53 in unstressed cells through C-terminal phosphorylation. *J Biol Chem.*, **276**: 31819-1824 (2001).

Choi CY, Kim YH, Kwon HJ, Kim Y. The homeodomain protein NK-3 recruits Graucho and a histone deacetylase complex to repress transcription. *J Biol Chem.*, **274**: 33194-33197 (1999).

Choi DW, Seo YM, Kim EA, Sung KS, Ahn JW, Park SJ, Lee SR, Choi CY. Ubiquitination and degradation of homeodomain-interacting protein kinase 2 by WD40 repeat/SOCS box protein WSB-1. *J. Biol. Chem.*, **283**: 4682-4689 (2008).

Ciardiello F, McGeady ML, Kim N, Basolo F, Hynes N, Langton BC, Yokozaki H, Saeki T, Elliott JW, Masui H, et al. Transforming growth factor- α expression is enhanced in human mammary epithelial cells transformed by an activated c-Ha-ras protooncogene but not by the c-neu protooncogene, and overexpression of the transforming growth factor- α complementary DNA leads to transformation. *Cell Growth Differ.*, **1**: 407-420 (1990).

Dauth I, Krüger J, Hofmann TG. Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res.*, **67**: 2274-2279 (2007).

DeYoung MP, Johannessen CM, Leong CO, Faquin W, Rocco JW, Ellisen LW. Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, **66**: 9362-9368 (2006).

De Laurenzi V, Melino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci.*, **926**: 90-100 (2000).

Deshmukh H, Yeh TH, Yu J, Sharma MK, Perry A, Leonard JR, Watson MA, Gutmann DH, Nagarajan R. High-resolution, dual-platform aCGH analysis reveals frequent HIPK2 amplification and increased expression in polycytic astrocytomas. *Oncogene*, **27**: 4745-4751 (2008).

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res.*, **8**: 494-501(2002).

Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, **444**: 638-642 (2006).

Di Stefano V, Rinaldo C, Sacchi A, Soddu S, D'Orazi G. Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.*, **293**: 311-320 (2004a).

Di Stefano V, Blandino G, Sacchi A, Soddu S, D'Orazi G. HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function. *Oncogene*, **23**: 5185-5192 (2004b).

Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*, **20**: 3193-31205 (2001).

Doxakis E, Huang EJ, Davies AM. Homeodomain-interacting protein kinase-2 regulates apoptosis in developing sensory and sympathetic neurons. *Curr Biol.*, **14**: 1761-5 (2004).

D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, **4**: 11-19 (2002).

Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, **416**: 560-564 (2002).

Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*, **7**: 363-373 (2005).

Fomenkov A, Zangen R, Huang YP, Osada M, Guo Z, Fomenkov T, Trink B, Sidransky D, Ratovitski EA. RACK1 and stratifin target DeltaNp63alpha for a proteasome degradation in

head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage. *Cell Cycle*, **3**: 1285-1295 (2004).

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, **54**: 4855-4878 (1994).

Gresko E, Roscic A, Ritterhoff S, Vichalkovski A, del Sal G, Schmitz ML. Autoregulatory control of the p53 response by caspase-mediated processing of HIPK2. *EMBO J.* **25**: 1883-1894 (2006).

Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, Lena AM, Candi E, Terrinoni A, Catani MV, Oren M, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Müller M. TA p63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.*, **24**: 2458-2471 (2005).

Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, Roscic A, Fröbius K, Kotevic I, Vichalkovski A, Hess D, Hemmings BA, Schmitz ML. PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene*, **28**: 698-708 (2009).

Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res.*, **59**: 4165-4169 (1999).

Harada J, Kokura K, Kanei-Ishii C, Nomura T, Khan MM, Kim Y, Ishii S. Requirement of the co-repressor homeodomain-interacting protein kinase 2 for ski-mediated inhibition of bone morphogenetic protein-induced transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, **278**: 38998-39005 (2003).

Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, **28**: 739-45 (2007).

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**: 296-9 (1997).

Helton ES, Zhu J, Chen X. The unique NH2-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of DeltaN variant of p63. *J. Biol. Chem.*, **281**: 2533-2542 (2005).

Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**: 5462-5467 (2000).

Hofmann TG, Mincheva A, Lichter P, Dröge W, Schmitz ML. Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34. *Biochimie.*, **82**: 1123-1127 (2000).

Hofmann TG, Möller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Dröge W, Will H, Schmitz ML. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol.*, **4**:1-10 (2002).

Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.*, **63**: 8271-8277 (2003).

Hofmann TG, Jaffray E, Stollberg N, Hay RT, Will H. Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification. *J. Biol. Chem.*, **280**: 29224-29232 (2005).

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutation in human cancers. *Science*, **253**: 49-53 (1991).

Honda R., Tanaka H., Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.*, **420**: 25-27 (1997).

Huang Y, Sen T, Nagpal J, Upadhyay S, Trink B, Ratovitski E, Sidransky D. ATM kinase is a master switch for the Delta Np63 alpha phosphorylation/degradation in human head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage. *Cell Cycle*, **7**:2846-2855 (2008).

Ichwan SJ, Yamada S, Sumrejkanchanakij P, Ibrahim-Auerkari E, Eto K, Ikeda MA. Defect in serine 46 phosphorylation of p53 contributes to acquisition of p53 resistance in oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene*, **25**: 1216-1224 (2006).

Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.*, **17**:7480-7489 (1998).

Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases hipk1 and hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol. Cell. Biol.*, **26**: 2758-2771 (2006).

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, **90**: 809-819 (1997).

Keyes WM, Wu Y, Vogel H, Guo X, Lowe SW, Mills AA. P63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.*, **19**:1986-1999 (2005).

Keyes WM, Vogel H, Koster MI, Guo X, Qi Y, Petherbridge KM, Roop DR, Bradley A, Mills AA. P63 heterozygous mutant mice are not prone to spontaneous or chemically induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 8435-8440 (2006).

Kim YH, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J. Biol. Chem.*, **273**: 25875-25879 (1998).

Kim EJ, Park JS, Um SJ. Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family in vivo. *J Biol Chem.*, **277**:32020-32028 (2002).

Kim SY, Choi DW, Kim EA, Choi CY. Stabilization of HIPK2 by escape from proteasomal degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase Siah1. *Cancer Lett.*, **279**: 177-184. (2009).

King KE, Ponnamperna RM, Yamashita T, Tokino T, Lee LA, Young MF, Weinberg WC. DeltaNp63alpha functions as both a positive and a negative transcriptional regulator and blocks in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Oncogene*, **22**: 3635-3644 (2003).

King KE, Ponnamperna RM, Gerdes MJ, Tokino T, Yamashita T, Baker CC, Weinberg WC. Unique domain functions of p63 isoforms that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. *Carcinogenesis*, **27**: 53-63 (2006).

King KE, Weinberg WC. p63: defining roles in morphogenesis, homeostasis, and neoplasia of the epidermis. *Mol Carcinog.*, **46**:716-724 (2007).

Koker MM, Kleer CG. p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, **28**: 1506-1512 (2004).

Kondo S, Lu Y, Debbas M, Lin AW, Sarosi I, Itie A, Wakeham A, Tuan J, Saris C, Elliott G, Ma W, Benchimol S, Lowe SW, Mak TW, Thukral SK. Characterization of cells and gene-targeted mice deficient for the p53-binding kinase homeodomain-interacting protein kinase 1 (HIPK1). *Proc. Natl: Acad. Sci. U.S.A.*, **100**: 5431-5436 (2003).

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**: 299-303 (1997).

Li X., Dumont P., Della Pietra A., Shetler C., Murphy ME. The codon 47 polymorphism is functional significant. *J. Biol. Chem.*, **280**: 24245-24251 (2005).

Li Q, Wang X, Wu X, Rui Y, Liu W, Wang J, Wang X, Liou YC, Ye Z, Lin SC. Daax cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death. *Cancer Res.*, **67**: 66-74 (2007).

Li XL, Arai Y, Harada H, Shima Y, Yoshida H, Rokudai S, Aikawa Y, Kimura A, Kitabayashi I. Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML-1 and p53-mediated transcription. *Oncogene*, **26**:7231-7239 (2007).

Liefer KM, Koster MI, Wang XJ, Yang A, McKeon F, Roop DR. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **60**: 4016-4020 (2000).

Lin Z, Liu M, Li Z, Kim C, Lee E, Kim I. DeltaNp63 protein expression in uterine cervical and endometrial cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.*, **132**:811-816 (2006).

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**: 1912-1934 (2002).

Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.*, **13**:927-34 (2006).

Matheny KE, Barbieri CE, Sniezek JC, Arteaga CL, Pietenpol JA. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling decreases p63 expression in head and neck squamous carcinoma cells. *Laryngoscope*, **113**: 936-939 (2003).

Marchbank A, Su LJ, Walsh P, DeGregori J, Penheiter K, Grayson TB, Dellavalle RP, Lee LA. The CUSP DeltaNp63alpha isoform of human p63 is downregulated by solar-simulated ultraviolet radiation. *J Dermatol Sci.*, **32**:71-74 (2003).

Mayo LD, Seo YR, Jackson MW, Smith ML, Rivera Guzman J, Korgaonkar CK, Donner DB. Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem.* **280**: 25953-25959 (2005).

Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. P73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 605-615 (2002).

Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, Knight RA. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci.*, **28**:663-670 (2003).

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398**: 708-713 (1999).

Mills AA. P63: oncogene or tumor suppressor? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**:38-44 (2006).

Min BM, Baek JH, Shin KH, Gujuluva CN, Cherrick HM, Park NH. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Eur J Cancer B Oral Oncol.*, **30B**:338-345(1994).

Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* **2**:371-386 (2004).

Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol.*, **17**:631-636 (2005).

Möller A, Sirma H, Hofmann TG, Rueffer S, Klimczak E, Dröge W, Will H, Schmitz ML. PML is required for homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Res.*, **63**: 4310-4314 (2003a).

Möller A, Sirma H, Hofmann TG, Staeger H, Gresko E, Lüdi KS, Klimczak E, Dröge W, Will H, Schmitz ML. Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression. *Oncogene*, **22**: 8731-8737 (2003b).

Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. P53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Diff.*, **13**: 962-972 (2006).

Oberst A, Rossi M, Salomoni P, Pandolfi PP, Oren M, Melino G, Bernassola F. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **331**: 707-712 (2005).

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* **102**: 849-862 (2000).

Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, Nakamura Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell*, **8**: 85-94 (2001)

Ohtani S, Kagawa S, Tango Y, Umeoka T, Tokunaga N, Tsunemitsu Y, Roth JA, Taya Y, Tanaka N, Fujiwara T. Quantitative analysis of p53-targeted gene expression and visualization of p53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 in vivo. *Mol Cancer Ther.*, **3**: 93-100 (2004).

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.*, **10**: 431-42 (2003).

Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat. Med.*, **4**: 839-843 (1998).

Osada M, Park HL, Nagakawa Y, Yamashita K, Fomenkov A, Kim MS, Wu G, Nomoto S, Trink B, Sidransky D. Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Mol Cell Biol.*, **25**: 6077-6089 (2005).

Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Devgan V, Della Gatta G, Koster MI, Zhang Z, Wang J, Tommasi di Vignano A, Kitajewski J, Chiorino G, Roop DR, Missero C, Dotto GP. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev.*, **20**:1028-1042 (2006).

Paramio JM, Segrelles C, Laín S, Gómez-Casero E, Lane DP, Lane EB, Jorcano JL. p53 is phosphorylated at the carboxyl terminus and promotes the differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol Carcinog.*, **29**:251-262 (2000).

Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol.*, **113**:1099-1105 (1999).

Patturajan M, Nomoto S, Sommer M, Fomenkov A, Hibi K, Zangen R, Poliak N, Califano J, Trink B, Ratovitski E, Sidransky D. DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer Cell*, **1**: 369-379 (2002).

Papoutsaki M, Moretti F, Lanza M, Marinari B, Sartorelli V, Guerrini L, Chimenti S, Levrero M, Costanzo A. A p38-dependent pathway regulates DeltaNp63 DNA binding to p53-dependent promoters in UV-induced apoptosis of keratinocytes. *Oncogene*, **24**:6970-6975 (2005).

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**: 747-752 (2000).

Pierantoni GM, Bulfone A, Pentimalli F, Fedele M, Iuliano R, Santoro M, Chiariotti L, Ballabio A, Fusco A. High mobility group I (Y) proteins bind HIPK2, a serine threonine kinase protein which inhibits cell growth. *Oncogene*, **20**: 6132-6141 (2001).

Pierantoni GM, Bulfone A, Pentimalli F, Fedele M, Iuliano R, Santoro M, Chiariotti L, Ballabio A, Fusco A. The homeodomain-interacting protein kinase 2 gene is expressed late in embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**: 942-947 (2002).

Pierantoni GM, Rinaldo C, Mottolese M, Di Benedetto A, Esposito F, Soddu S, Fusco A. High-mobility group A1 inhibits p53 by cytoplasmic relocation of its proapoptotic activator HIPK2. *J. Clin. Invest.*, **117**: 693-702 (2007).

Puca R, Nardinocchi L, Pistritto G, D'Orazi G. Overexpression of HIPK2 circumvents the blockade of apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.*, **109**:403-410 (2008).

Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* **21**: 267-271(1996).

Ribeiro-Silva A, Becker de Moura H, Ribeiro do Vale F, Zucoloto S. The differential regulation of human telomerase reverse transcriptase and vascular endothelial growth factor may contribute to the clinically more aggressive behavior of p63-positive breast carcinomas. *Int J Biol Markers*, **20**:227-2234 (2005).

Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S. MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell*, **25**: 739-750 (2007a).

Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S. HIPK2: a multitasking partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol.*, **85**:411-418 (2007b).

Rinaldo C, Siepi F, Prodosmo A, Soddu S. HIPKs: Jack of all trades in basic nuclear activities. *Biochim Biophys Acta.*, **1783**: 2124-2129 (2008).

Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, **9**:45-56(2006).

Rödicker F, Pützer BM. p53 Is effective in p53-null pancreatic cancer cells resistant to wild-type TP53 gene replacement. *Cancer Res.*, **63**: 2737-2741(2003).

Roscic A, Möller A, Calzado MA, Renner F, Wimmer VC, Gresko E, Lüdi KS, Schmitz ML. Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2. *Mol. Cell*, **24**: 77-89 (2006).

Rui Y, Xu Z, Lin S, Li Q, Rui H, Luo W, Zhou HM, Cheung PY, Wu Z, Ye Z, Li P, Han J, Lin SC. Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation. *Embo J.*, **23**: 4583-4594 (2004).

Sasaki Y, Naishiro Y, Oshima Y, Imai K, Nakamura Y, Tokino T. Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene*, **24**:5131-5136 (2005).

Sbisà E, Mastropasqua G, Lefkimmatis K, Caratozzolo MF, D'Erchia AM, Tullo A. Connecting p53 to cellular proliferation: the example of the adenosine deaminase target gene. *Cell Cycle*, **5**:205-212 (2006).

Senoo M, Tsuchiya I, Matsumura Y, Mori T, Saito Y, Kato H, Okamoto T, Habu S. Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Delta Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br. J. Cancer*, **84**: 1253-1241 (2001).

Serber Z, Lai HC, Yang A, Ou HD, Sigal MS, Kelly AE, Darimont BD, Duijf PH, Van Bokhoven H, McKeon F, Dötsch V. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol. Cell Biol.*, **22**: 8601-8611 (2002).

Shilol, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer*, **3**: 155-168 (2003).

Sung KS, Go YY, Ahn JH, Kim YH, Kim Y, Choi CY. Differential interactions of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by phosphorylation-dependent sumoylation. *FEBS Lett.*, **579**: 3001-3008 (2005).

Tanière P, Martel-Planche G, Saurin JC, Lombard-Bohas C, Berger F, Scoazec JY, Hainaut P. TP53 mutations, amplification of P63 and expression of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the oesophagus from a low incidence area in Western Europe. *Br. J. Cancer*, **85**: 721-726 (2001).

Testoni B, Borrelli S, Tenedini E, Alotto D, Castagnoli C, Piccolo S, Tagliafico E, Ferrari S, Viganò MA, Mantovani R. Identification of new p63 targets in human keratinocytes. *Cell Cycle*, **5**:2805-2811 (2006).

Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. TP53INP1 and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem.*, **278**: 37722-37729 (2003).

Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R, Khavari PA. p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev.*, **20**: 3185-3197 (2006).

van Bokhoven H, Brunner HG. Splitting p63. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**: 1-13 (2002).

Vousden KH, Lu X. Live or die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, **2**:594-604 (2002).

Wang BY, Gil J, Kaufman D, Gan L, Kohtz DS, Burstein DE. P63 in pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors. *Hum. Pathol.*, **33**:921-926 (2002).

Wang SY, Iordanov M, Zhang Q. c-Jun NH2-terminal kinase promotes apoptosis by down-regulating the transcriptional co-repressor CtBP. *J. Biol. Chem.*, **281**: 34810-34815 (2006).

Wee HJ, Voon DC, Bae SC, Ito Y. PEBP2-beta/CBF-beta-dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis. *Blood*, **112**: 3777-3787 (2008).

Wei G, Ku S, Ma GK, Saito S, Tang AA, Zhang J, Mao JH, Appella E, Balmain A, Huang EJ. HIPK2 represses beta-catenin-mediated transcription, epidermal stem cell expansion, and skin tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**:13040-13045 (2007).

Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The DeltaNp63 phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3-sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol.*, **23**:2264-2276 (2003).

Westfall MD, Joyner AS, Barbieri CE, Livingstone M, Pietenpol JA. Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha. *Cell Cycle*, **4**:710-716 (2005).

Wiggins AK, Wei G, Doxakis E, Wong C, Tang AA, Zang K, Luo EJ, Neve RL, Reichardt LF, Huang EJ. Interaction of Brn3a and HIPK2 mediates transcriptional repression of sensory neuron survival. *J. Cell. Biol.*, **167**:257-267 (2004).

Winter M, Sombroek D, Dauth I, Moehlenbrink J, Scheuermann K, Crone J, Hofmann TG. Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. *Nat. Cell Biol.*, **10**: 812-824 (2008).

Wu G, Osada M, Guo Z, Fomenkov A, Begum S, Zhao M, Upadhyay S, Xing M, Wu F, Moon C, Westra WH, Koch WM, Mantovani R, Califano JA, Ratovitski E, Sidransky D, Trink B. DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res.*, **65**:758-766 (2005).

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. *Mol. Cell*, **2**:305-316 (1998).

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, **398**: 714-718 (1999).

Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **1**:199-207 (2000).

Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. on the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.*, **18**: 90-95 (2002).

Zangen R, Ratovitski E, Sidransky D. DeltaNp63alpha levels correlate with clinical tumor response to cisplatin. *Cell Cycle*, **4**:1313-1315 (2005).

Zhang Q, Yoshimatsu Y, Hildebrand J, Frisch SM, Goodman RH. Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by downregulating the transcriptional corepressor CtBP. *Cell*, **115**: 177-186 (2003).

Zhang J, Pho V, Bonasera SJ, Holtzman J, Tang AT, Hellmuth J, Tang S, Janak PH, Tecott LH, Huang EJ. Essential function of HIPK2 in TGF-beta-dependent survival of midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci.*, **10**:77-86 (2007).