

**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  
-XXIII CICLO-**

**CARATTERIZZAZIONE FISICA E FUNZIONALE DELLA  
NUOVA INTERAZIONE TRA LA CHINASI PRO-  
APOPTOTICA HIPK2 E IL FATTORE  
ASSOCIATO ALLA SINDROME DI RETT, MeCP2  
(MED/04)**

Coordinatore: Prof. Giorgio Pranterà

Tutor: Dott.ssa Silvia Soddu

Dottoranda: Dott.ssa Giorgia Bracaglia

# INDICE

|                                                                                  |         |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>INTRODUZIONE</b> .....                                                        | pag. 3  |
| La Chinasi HIPK2 .....                                                           | pag. 3  |
| Struttura e regolazione della proteina HIPK2 .....                               | pag. 3  |
| Ruolo di HIPK2 nell'apoptosi .....                                               | pag. 6  |
| Il fattore associato alla Sindrome di Rett, MeCP2.....                           | pag. 9  |
| La Sindrome di RETT .....                                                        | pag. 12 |
| <br><b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....                                                | pag. 16 |
| <br><b>RISULTATI</b> .....                                                       | pag. 17 |
| HIPK2 è una nuova proteina interattrice di MeCP2 .....                           | pag. 17 |
| MeCP2 è fosforilata da HIPK2 <i>in vitro</i> .....                               | pag. 18 |
| Il residuo aminoacidico serina 80 di MeCP2                                       |         |
| è il sito specifico fosforilato da HIPK2 <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i> ..... | pag.20  |
| MeCP2 e HIPK2 cooperano nell'induzione dell'apoptosi .....                       | pag. 22 |
| La fosforilazione di MeCP2 nella serina 80 contribuisce all'apoptosi .....       | pag. 24 |
| <br><b>DISCUSSIONE</b> .....                                                     | pag. 26 |

|                                                              |                    |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>MATERIALI E METODI .....</b>                              | <b>pag. 30</b>     |
| Linee cellulari: colture cellulari e immortalizzazione ..... | pag. 30            |
| Differenziamento Neuronale .....                             | pag. 30            |
| Vettori d'espressione e trasfezioni .....                    | pag. 30            |
| Interferenza mediata da RNA .....                            | pag. 31            |
| Saggi di vitalità .....                                      | pag. 31            |
| Analisi mediante Western Blot .....                          | pag. 31            |
| Saggi di Co-Immunoprecipitazione .....                       | pag. 32            |
| Saggio chinamico in vitro .....                              | pag. 32            |
| <br><b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                | <br><b>pag. 34</b> |
| <br><b>RINGRAZIAMENTI .....</b>                              | <br><b>pag. 44</b> |

# INTRODUZIONE

## La Chinasi HIPK2

La proteina HIPK2 (Homodomain Interacting Protein Kinase 2) è una serina-treonina chinasi che è stata individuata alla fine degli anni 90. Il gene umano che la codifica è stato isolato e mappato sul cromosoma 7q32-34 (Hofmann et al., 2000). Appartiene ad una nuova famiglia di corepressori per fattori di trascrizione omeodominio (Kim et al., 1998). Appartengono alla stessa famiglia anche le proteine HIPK1 e HIPK3, che condividono la caratteristica di possedere un dominio chinamico conservato e un dominio di legame alle proteine omeodominio. HIPK4, quarto membro meno conservato della famiglia, è stato identificato successivamente mediante tecniche computerizzate delle sequenze ottenute dalla decifrazione del genoma umano (Manning et al., 2002). Tale 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. Cio' sembra essere confermato dal fenotipo dei topi *knock out* (KO): infatti, mentre i singoli KO per *Hipk1* e *Hipk2* sono vitali e fertili nonostante una serie di difetti a livello del sistema nervoso (vedi dopo) (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. E' molto conservata nei Vertebrati con un altissimo tasso di omologia tra uomo e topo (98%). L'RNA messaggero di HIPK2 è espresso a livelli elevati durante le ultime fasi dell'embriogenesi, preferenzialmente nella retina, nel muscolo e nel tessuto neuronale mentre è ubiquitario nell'uomo e nei topi adulti (Pierantoni et al, 2002).

Strutturalmente HIPK2 presenta diversi domini: una 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 1).

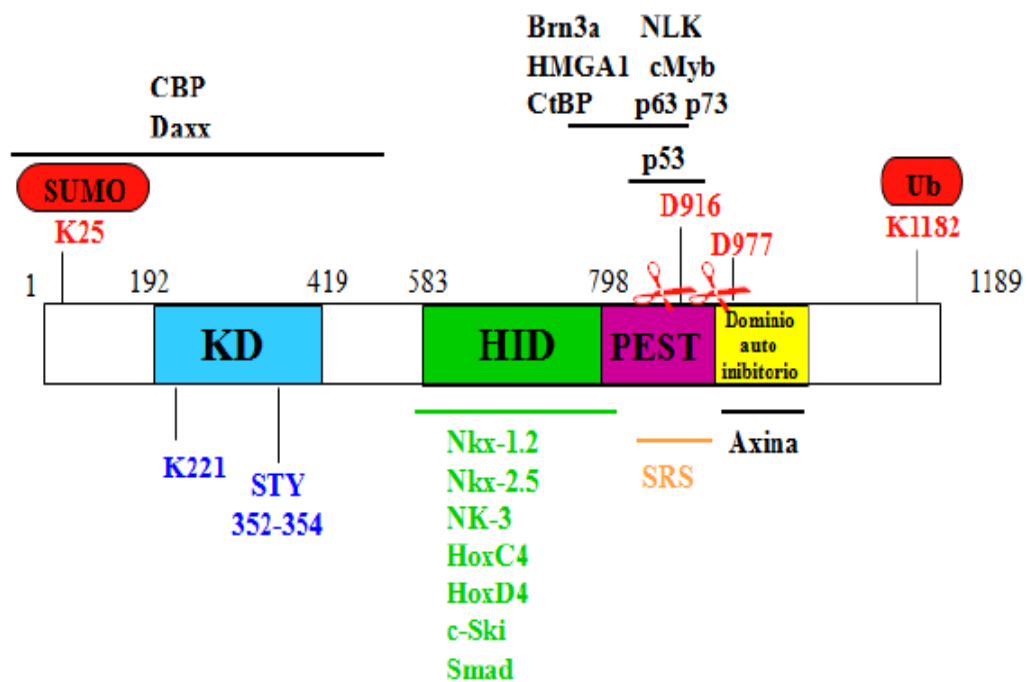


**Figura 1. Rappresentazione schematica della proteina HIPK2 murina.** Le linee orizzontali al di fuori dei riquadri mostrano le regioni coinvolte nel legame con le proteine indicate. K25: sito di sumulazione. KD: dominio chinasico, al cui interno K221 è la lisina del sito catalitico e STY il sito putativo di regolazione. HID: dominio di interazione con i fattori omeobox. PEST: regione contenente le sequenze PEST. D916 E D977 siti di taglio ad opera delle caspasi (indicate dalle forbici). SRS: segnale di ritenzione negli speckle: K1182: sito di ubiquitinazione (*modificato da Rinaldo et al., 2007*)

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) 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). E' 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 chinasica può contribuire alla regolazione della trascrizione mediata da HIPK2.

Il dominio omeobox media l'interazione con i fattori di trascrizione omeodominio delle famiglie NK e HOX. L'identificazione di HIPK2, infatti, è avvenuta 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, è stato studiato minuziosamente il suo legame con NK-3: in questo contesto HIPK2 lavora 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 dimostrato 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 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- $\beta$  (Trasforming Growth Factor  $\beta$ ), BMP (Bone Morphogenetic Protein) e attivina.

Diversamente da quanto si verifica di solito nelle proteine che la possiedono (Rechsteiner and Rogers, 1996), la sequenza PEST [regione ricca in residui di prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T)] non è coinvolta nella degradazione proteolitica (Rinaldi et al., 2007a), bensì media l'interazione con la maggior parte dei fattori non omeobox che legano HIPK2, tra i quali p53 e gli altri membri della famiglia, p73 e p63, (Kim et al., 1998), CtBP, HMGA e altre proteine.

Il ruolo attribuito al putativo dominio di autoinibizione deriva dall'osservazione di un'aumentata attività chinasica 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'Axi1 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 inibitorio di HIPK2, permettendone, in tal modo, l'attivazione (Rui et al., 2004). L'esistenza del dominio auto inibitorio, inoltre, è supportata 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 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 all'attività sui fattori bersaglio; l'ubiquitinazione, invece, è stata associata 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, instaurando 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 attraverso la via proteosomica (Rinaldo et al., 2007a). In maniera interessante, il sito di ubiquitinazione è situato nel dominio auto inibitorio 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 della proteina resistente alla degradazione, HIPK2-K1182R, risulta avere un'aumentata attività apoptotica (Rinaldo et al., 2007a).

Recentemente sono state identificate altre E3 ubiquitina ligasi responsabili del controllo della stabilità di HIPK2 : è stato dimostrato, infatti, che la ligasi WSB-1 e le proteine Siah 1 e Siah-2, appartenenti alla famiglia delle ligasi *Ring Finger*, legano HIPK2 catalizzandone la poli-ubiquitinazione e la degradazione via proteo soma e regolandone sia il *turn.over*, in condizioni normali, che l'attivazione in risposta a danno severo al DNA o ad ipossia (Choi et al., 2008; Winter et al., 2008; 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; tuttavia, negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato, attraverso la caratterizzazione dell'interazione con un numero crescente di proteine, il coinvolgimento di HIPK2 anche in altri processi biologici, quali sviluppo embrionale, differenziamento, proliferazione e apoptosi (Rinaldo et al., 2007b; Calzado et al., 2007) (Figura 2). 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.

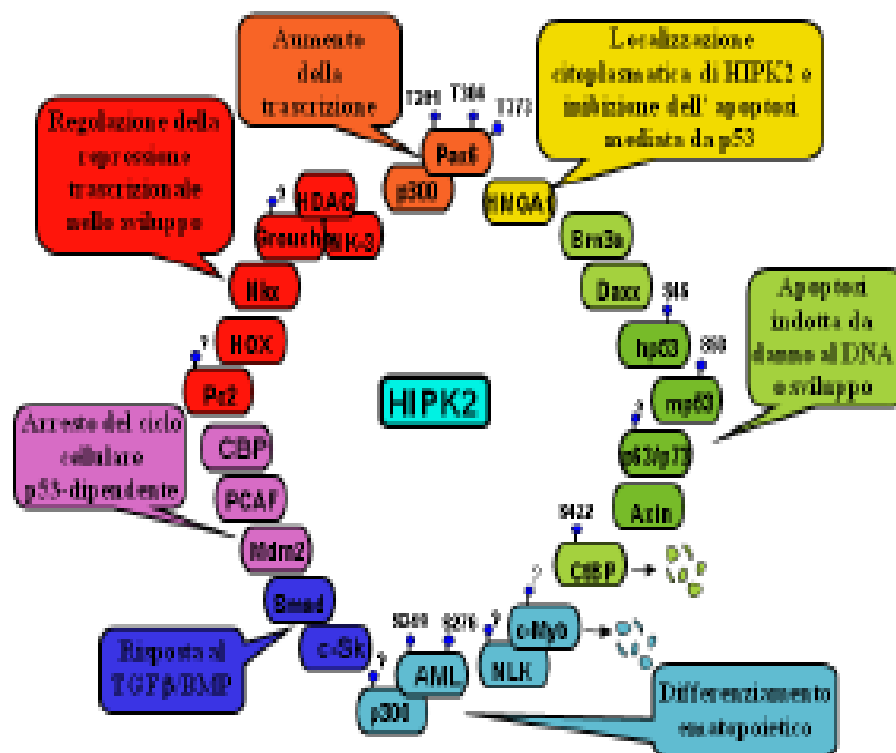


**Figura 2. Rappresentazione schematica dei fattori che interagiscono con HIPK2.** Delle proteine riportate sono indicate l'attività biologica e i siti di fosforilazione da parte di HIPK2 (modificato da Rinaldo et al., 2007b).

L'apoptosi mediata da HIPK2 può essere dipendente o indipendente dalla via di attivazione dell'oncosoppressore p53.

In seguito ad un danno grave al DNA, HIPK2 forma un complesso con p53 e la fosforila nel residuo amminoacidico serina 46 (Di Stefano et al., 2004; Dauth et al., 2007) promuovendo, in tal modo, la conseguente trascrizione 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., 2004; Di Stefano et al., 2004; Cecchinelli et al., 2006b; Mayo et al., 2005).

Le funzioni apoptotiche di HIPK2 non sono, tuttavia, limitate all'azione su p53, ma coinvolgono anche vie di segnalazione indipendenti da essa. Infatti, 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 tal modo, alla degradazione via proteasoma. La diminuzione dei livelli proteici di CtBP sensibilizza, difatti, le cellule all'apoptosi (Zhang et al., 2003). La fosforilazione di CtBP indotta da HIPK2 è mediata sia direttamente che indirettamente attraverso la via di segnalazione delle JNK (Wang et al., 2006) e avviene in seguito 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 $\beta$ , 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; recentemente è stato 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).

E' stato descritto un ruolo di HIPK2 nella morte cellulare programmata associata allo sviluppo neuronale, sia in studi effettuati in vivo, su topi geneticamente modificati, che in modelli di sviluppo neuronale in vitro. Gli embrioni provenienti dai topi doppi 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 persi progressivamente tra i 9,5 e i 12,5 giorni post-coitus (Zhang et al., 2007). Inoltre, nei neuroni del topo singolo KO per *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). E' 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 da TGF- $\beta$  durante la morte cellulare programmata. I topi *Hipk2*<sup>-/-</sup>, 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 TGF- $\beta$  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 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.

## **Il fattore associato alla Sindrome di Rett, MeCP2**

La proteina MeCP2 (Methyl-CpG-Binding Protein) è una proteina ubiquitaria, maggiormente espressa a livello del tessuto nervoso. Il gene è costituito da quattro esoni, che codificano due diverse isoforme della proteina, le quali derivano da uno splicing alternativo del gene nella porzione N-terminale; la differenza di questi trascritti sta nella presenza o assenza dell'esone due. Infatti, se l'esone due è presente nel trascritto, la sintesi proteica inizia dal suo ATG e viene prodotta l'isoforma più conosciuta della proteina, ovvero MeCP2 $\beta$ , costituita da 486 aminoacidi. In mancanza dell'esone 2, invece, la sintesi proteica inizia dall'ATG presente sull'esone 1, portando alla formazione dell'isoforma MeCP2 $\alpha$ , scoperta di recente, costituita da 498 aminoacidi. La funzionalità della proteina nelle due diverse isoforme rimane essenzialmente la stessa (Kriaucionis e Bird, 2004).

*MeCP2* è localizzato sul braccio lungo del cromosoma X in posizione 28 (Xq28). Diverse mutazioni di MeCP2 sono state riscontrate in un particolare disordine neurodegenerativo che colpisce principalmente le bambine, chiamato Sindrome di Rett. Tali mutazioni sono state individuate in più siti dell'intera proteina.

La struttura di MeCP2 (figura 3) è caratterizzata da due domini principali: l'MBD (methyl binding domain) e il TRD (transcriptional repression domain). L'MBD, regione di 84 aminoacidi, è il dominio attraverso il quale MeCP2 lega l'eterocromatina metilata; in particolare il legame avviene su quelle sequenze di DNA che hanno subito una modificazione chimica nota come metilazione. Il secondo dominio (TRD), che è lungo 105 aminoacidi, è responsabile della repressione trascrizionale mediata da MeCP2, che causa il silenziamento di numerosi geni bersaglio (Chandler et al., 1999). In aggiunta, MeCP2 presenta, nella sua porzione finale, un dominio C-terminale (C-term) le cui funzioni non sono ancora ben note ma che sembrano importanti sia per l'interazione della proteina con altri specifici fattori proteici con i quali lavora, sia per la stabilità del legame al DNA, sia per la propria autoregolazione all'interno delle cellule (Wakefield et al., 1999).



**Figura 3 Struttura della proteina MeCP2.**

Originariamente la proteina MeCP2 è stata identificata nel laboratorio del Dr Adrian Bird (Edinburgo, UK). MeCP2 appartiene alla famiglia delle "Methyl CpG-Binding Proteins" alla quale appartengono anche le proteine MBD1, MBD2, MBD4 e KAISO, tutte caratterizzate dal dominio MBD conservato (Hendrych e Bird, 1998). MeCP2 viene generalmente descritta come un repressore trascrizionale. Attraverso il dominio TRD, infatti, MeCP2 può reclutare il complesso HDAC, il corepressore Sin3A, e deacetilare le proteine istoniche, spegnendo il segnale trascrizionale (Chahrour e Zoghbi, 2007).

Tuttavia, studi recenti, indicano la proteina MeCP2 come un attivatore trascrizionale; infatti, in uno studio comparato di un profilo genico di cellule ipotalamiche, nulle per il gene *Mecp2* e indotte ad iperesprimere la proteina, è stata dimostrata l'attivazione trascrizionale di un numero cospicuo di geni tra cui il recettore per gli oppioidi *Oprk1*, *Sst*, *Gamt* e *Gprn1* (Chahrour et al., 2008). La proteina MeCP2, quindi, ha un ruolo regolatore sull'espressione genica in quanto agisce come regolatore della trascrizione del DNA.

L'analisi di espressione di MeCP2 ha inizialmente evidenziato la presenza ubiquitaria della proteina nei tessuti. Successivamente, altri studi, hanno mostrato una maggior espressione a livello del sistema nervoso centrale; è stato, infatti, dimostrato che i livelli di MeCP2 aumentano dopo la nascita fino all'età adulta. Inoltre, i dettagli dell'espressione di MeCP2, nel sistema nervoso, suggeriscono un ruolo della proteina nella maturazione neuronale (Shahbazian et al., 2002).

Negli ultimi tempi, diversi studi, nel sistema nervoso, hanno messo in luce che la regolazione di alcuni geni, coinvolti nella maturazione del sistema neuronale, è influenzata dalla fosforilazione della proteina MeCP2, che è soggetta a diversi stimoli. In particolare, è stato dimostrato che la repressione trascrizionale, mediata da MeCP2, di *Bdnf* (Brain-Derived Neurotrophic Factor), può essere spenta quando la proteina viene fosforilata nel residuo aminoacidico serina 421; questa modificazione, infatti, causa un cambiamento dell'affinità di legame al promotore di *Bdnf* (Chen et al., 2003). Inoltre, è stato anche dimostrato che la fosforilazione di MeCP2 in serina 421 promuove la sua abilità nella regolazione della crescita assonico-dendritica e la maturazione delle spine (Zhou et al., 2006). Recentemente è stato dimostrato che la defosforilazione di MeCP2 nel residuo serina 80, annulla il legame della proteina ai diversi promotori dei geni bersaglio che sono coinvolti nell'attività neuronale (Tao et al., 2009). Tao e coautori hanno prodotto dei topi geneticamente modificati nel residuo serina 80 (MeCP2<sup>S80A</sup> knock-in mice) e nel residuo 421 (MeCP2<sup>S421A;S421A</sup> knock-in mice), in cui MeCP2, così mutata, risulta non fosforilabile nei suddetti siti: questi topi mostrano chiari difetti nell'attività locomotoria e neuronali, suggerendo la rilevanza di queste modificazioni nelle funzioni neurologiche.

E' stato ipotizzato che la fosforilazione in serina 421 sia dovuta all'attività chinasi della proteina CaMKII/IV che viene attivata dagli ioni  $Ca^{2+}$  liberati dai canali del  $Ca^{2+}$  in seguito allo stimolo sinaptico (Zhou et al., 2006). Per quanto riguarda la fosforilazione nel residuo aminoacidico serina 80, la chinasi responsabile è stata individuata nel corso di questa tesi (vedi risultati)

Le fosforilazioni di MeCP2, nel tessuto nervoso, non sono confinate ai due siti che sono stati precedentemente discussi; si conoscono, infatti, altri residui fosforilati. Ad esempio un altro sito importante nel sistema nervoso risulta essere il residuo aminoacidico serina 229, al quale, tuttavia, ad oggi non è stata correlata una specifica funzione.

L'importanza delle modificazioni della proteina MeCP2 assume notevole rilevanza nella Sindrome di RETT, malattia in cui è noto che le mutazioni di MeCP2 ne sono la causa ma in cui non è ancora chiaro come la mancata funzione della proteina, che determina o l'iperespressione o l'inattivazione di particolari geni, possa determinare il fenotipo alla base della patogenesi della malattia.

## **La Sindrome di RETT**

La Sindrome di Rett è una grave patologia neurologica che colpisce principalmente i soggetti di sesso femminile. Prende il nome dal medico austriaco , che per primo la descrisse nel 1966, Andreas Rett. La malattia, che si trasmette con modalità dominante legata al cromosoma X, è congenita, anche se non subito evidente alla nascita, e si manifesta dopo i primi sei mesi di vita, in una fascia di età che oscilla, tuttavia, entro i primi due o tre anni di vita. E' una malattia rara, che si manifesta con un'incidenza di 1 su 10000-15000 bambine nate (Korinetz CA, 1993), ed è considerata la seconda causa di ritardo mentale infantile.

Per quanto riguarda il quadro clinico-sintomatologico, si possono osservare gravi ritardi nell'acquisizione del linguaggio e nell'abilità della coordinazione motoria. Spesso la malattia è associata ad un severo ritardo mentale. La perdita delle capacità di prestazione è, generalmente, persistente e progressiva. Infatti, dopo una fase di vita iniziale normale, si assiste ad un arresto dello sviluppo e poi ad una regressione o perdita delle capacità acquisite. Si osserva un rallentamento dello sviluppo del cranio, normale alla nascita, rispetto al resto del corpo tra i 6 e 48 mesi di vita; inoltre, nello stesso periodo, si assiste ad una perdita delle capacità manuali, precedentemente sviluppate, alla quale vengono associati tipici movimenti stereotipati delle mani (HagBerg et al., 1981). In aggiunta, si assiste anche ad una perdita di interesse per l'ambiente sociale. I sintomi più severi, che tra l'altro sono la causa maggiore di exitus, riguardano la forte compromissione dell'apparato

respiratorio e cardiocircolatorio; possono, infatti, manifestarsi irregolarità nella respirazione, anomalie dell'EEG, epilessia e insufficienza cardiaca (Naidu, 1997).

La causa maggiore di questa patologia risiede nelle mutazioni riscontrate sul cromosoma X, nel gene *Mecp2* (Amir et al. 1999). Tuttavia, a causa dell'ampio quadro di mutazioni, che risiedono nel gene imputato, e della vasta eterogeneità clinica, si presenta una scarsa correlazione genotipo-fenotipo con quadri clinici di gravità diversa nei soggetti colpiti; sembrerebbe, tuttavia, che le mutazioni che interessano MeCP2 nelle aree più prossimali al sito di metilazione (MBD) siano associate a fenotipi più gravi (Ballestar et al., 2005).

L'azione sui vari geni bersaglio di MeCP2 potrebbe giustificare il quadro clinico della malattia che colpisce severamente il sistema nervoso; ad esempio, nelle linee linfoblastoidi delle pazienti Rett, è stata dimostrata una perdita dell'imprinting materno del gene *Dlx5*, bersaglio di MeCP2; questo gene codifica per alcune decarbossilasi dell'acido glutammico, pertanto è stato ipotizzato un interessamento della sintesi del neurotrasmettitore GABA e, quindi, della neurotrasmissione GABA-mediata (Horike et al., 2004).

La Sindrome di Rett nel 75% dei casi si manifesta come una forma classica, con la sintomatologia che è stata precedentemente descritta. Tuttavia, il 25% dei soggetti colpiti presenta una forma cosiddetta variante. A tal proposito, si distinguono 5 casi di forme varianti: la variante a linguaggio conservato, con decorso clinico più favorevole, la variante con convulsioni ad esordio precoce, le forme fruste, con segni clinici più sfumati, la variante congenita e la variante a regressione tardiva, di rarissima osservazione.

Dal punto di vista genetico, dopo aver identificato MeCP2 come causa della forma classica, sono stati scoperti due altri geni responsabili delle forme varianti : *Cdkl5* e *Foxg1* (Mencarelli et al., 2010; Philippe et al.2010; Sprovieri et al., 2009).

Mutazioni della proteina CDKL5 (Cyclin Dipendente Kinase Like) sono state confermate nel fenotipo Rett variante con convulsioni ad esordio precoce anche chiamata Sindrome di Hanefeld : è una malattia dominante in cui i maschi, avendo una sola copia del gene e perdipiù mutata, muoiono entro il primo anno di vita, mentre le femmine si ammalano di Sindrome di Rett (Mari et al., 2005). Il gene *cdkl5* si trova anch'esso sul cromosoma X, in particolare sul braccio corto in posizione 22 (Xp22). Appartiene alla famiglia delle serine-treonine chinasi ed è una proteina nucleare. E' stato dimostrato che CDKL5 e MeCP2 hanno lo stesso pattern di distribuzione sia temporale che regionale nel sistema nervoso durante la sinaptogenesi e la maturazione neuronale, suggerendo, quindi, che se questi geni

sono in grado di determinare un fenotipo Rett è ipotizzabile che abbiano un meccanismo patogenetico comune (Warby S, 2005; Rusconi et al., 2008).

Il gene *foxg1*, presente sul cromosoma 14, è stato recentemente individuato come terzo marker predittivo della Sindrome di Rett. Mutazioni a carico di *foxg1* sono state riscontrate nel fenotipo variante congenito, che presenta ritardo neuropsicomotorio precoce (Mencarelli et al., 2010). FOXG1 è un fattore di trascrizione espresso principalmente nel cervello; è stato, infatti, dimostrato che, interagendo con fattori quali JARID1B, HDAC1 e proteine della famiglia Groucho, esercita un ruolo fondamentale nelle prime fasi di sviluppo del sistema nervoso (Kawauchi et al., 2009 ). E' stato dimostrato il picco di espressione della proteina FOXG1 durante la vita embrionale: questo rappresenta una differenza fondamentale con MeCP2 che, al contrario, raggiunge la sua massima espressione dopo la nascita: ciò potrebbe spiegare la sintomatologia precoce rispetto alla forma classica.

Ad oggi, quindi, la Sindrome di Rett è noto sia dovuta mutazioni dei tre geni *Mecp2*, *Cdkl5* e *Foxg1* (figura 4). Tuttavia, non sono ancora chiari i meccanismi molecolari attraverso cui le tre proteine possano interagire e quindi cooperare nella patogenesi della malattia.

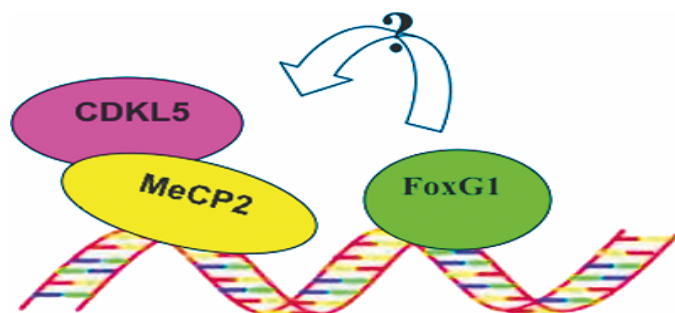


**Figura 4. Rappresentazione schematica dei tre geni mutati nella Sindrome di Rett**

Nel 2007, un gruppo di ricercatori di Edimburgo (Guy et al., 2007) coordinati dal Dr Adrian Bird, hanno creato dei topi *knockout* condizionali in cui hanno riaccessso *in vivo* il gene *Mecp2*, usando la tecnologia del sistema Cre-lox. In questi topi, infatti, erano presenti

sia il gene endogeno *Mecp2*, silenziato mediante l'inserzione di una sequenza di DNA *lox-Stop*, che ne impediva l'espressione, sia il transgene Cre-ER, formato dall'enzima Cre-Ricombinasi e dal recettore per gli estrogeni, che è importante per la riattivazione genica; i topi sono stati trattati con un farmaco, che legandosi ai recettori degli estrogeni, è capace di indurre la migrazione dell'enzima Cre-Ricombinasi dal citoplasma al nucleo, dove, rimuovendo la sequenza *lox-Stop*, riaccende l'espressione del gene *Mecp2*. I topi in cui il gene è stato silenziato hanno sviluppato sintomi tipici della Sindrome di Rett: inerzia, andatura anomala, tremore, respiro irregolare e condizioni generali debilitanti e una finestra temporale di vita molto breve. La riattivazione genica ha fatto osservare una progressiva e totale regressione dei sintomi nei topi femmine e nei maschi. Tuttavia, quest'ultimi sono riusciti a sopravvivere oltre le 17 settimane, tempo massimo della loro vita; infatti, i topi maschi presentano sintomi molto precoci e un tasso di mortalità elevato rispetto alle femmine, perché la mancanza di MeCP2 non può essere compensata dalla copia del gene come accade nelle femmine, che sviluppano i sintomi più tardivamente (Guy et al., 2007).

I topi femmine eterozigoti rappresentano il modello più appropriato per lo studio della Sindrome di Rett umana: sono infatti normali alla nascita e manifestano la sintomatologia in una finestra temporale che oscilla tra i 4 e 12 mesi di vita.

La ricerca di Bird ha dimostrato la ripresa della funzionalità dei neuroni: la riaccensione del gene *Mecp2*, infatti, ripristina la LTP (Long Term Potentiation), un meccanismo di plasticità neuronale che è alla base dei processi di apprendimento e della memoria.

Sebbene i dati di recupero funzionale ottenuti nei topi descritti sopra suggeriscano la possibilità di cura dei soggetti affetti dalla Sindrome di Rett, non esistono attualmente terapie curative per questi pazienti. Tuttavia, vengono utilizzati empiricamente farmaci per tentare di rallentare il decorso della malattia, tra cui farmaci anti-depressivi impiegati per la cura del Morbo di Parkinson e sindromi simili. In aggiunta, si cerca di recuperare il comportamento autistico delle bambine attraverso l'ippoterapia, la pet therapy e la musicoterapia.

Il quadro clinico e molecolare della Sindrome di Rett rimane ad oggi un vasto campo da studiare soprattutto per la comprensione di eventuali meccanismi patogenetici che danno il contributo allo sviluppo dei vari fenotipi.

## SCOPO DEL LAVORO

La grande eterogeneità che ruota attorno ai meccanismi alla base della patogenesi della Sindrome di Rett, ha portato la ricerca odierna ad indirizzarsi verso l'individuazione di probabili interruttori della proteina MeCP2, che possano in qualche modo suggerire un modello che consenta di bypassare i difetti genetici agendo sui partner proteici.

A questo scopo, all'Università dell'Insubria, nel gruppo di ricerca delle Dott.sse Nicoletta Landsberger e Charlotte Kilstrup-Nielsen, che da anni studiano la Sindrome di Rett, è stato utilizzato il saggio del doppio ibrido per cercare eventuali proteine capaci di interagire con MeCP2, che è stata usata come esca. Questa analisi ha dimostrato che una proteina che viene legata da MeCP2 la chinasi HIPK2, che da tempo è studiato nel nostro laboratorio.

Questi dati ci hanno spinto ad intraprendere il progetto di questa tesi: individuata questa interazione, infatti, scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare fisicamente e funzionalmente questo legame. In particolare, come primo punto del lavoro, abbiamo confermato l'interazione delle due proteine nei vari contesti cellulari e valutato, essendo HIPK2 una serina-treonina chinasi, se MeCP2 risulti fosforilata dalla chinasi. Inoltre, abbiamo cercato e individuato la regione in cui questa modificazione ha luogo. La seconda parte del lavoro, invece, è stata indirizzata verso l'analisi funzionale dell'espressione delle due proteine da sole e in co-espressione, mediante esperimenti di iperespressione di proteine native o di mutanti sito-specifici, oppure in assenza l'una dell'altra, mediante esperimenti di interferenza specifica dell'RNA.

Lo scopo principale del progetto, quindi, è stato poter saggiare se l'interazione fisica tra le due proteine avesse una rilevanza biologica ed un eventuale connessione con la Sindrome di Rett.

## RISULTATI

### **HIPK2 è una nuova proteina interattrice di MeCP2**

Negli ultimi anni diversi studi sono stati indirizzati verso la ricerca di probabili interattori della proteina MeCP2 che potessero giustificare e chiarire i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo della Sindrome di Rett. Infatti, l'eterogeneità della malattia farebbe supporre che possano esserci diverse proteine, collegate ad MeCP2, che potrebbero spiegarne la perdita di funzione nel corso della malattia. A tale scopo nei laboratori della Dott.ssa Landsberger, all'università dell'Insubria, è stato effettuato un'analisi mediante saggio del doppio ibrido in lievito, dove, utilizzando MeCP2 come esca, è stata pescata come sua proteina interattrice la chinasi HIPK2. Da tempo nel nostro laboratorio la proteina HIPK2 è ampiamente studiata. In particolare abbiamo contribuito a dimostrare che HIPK2, in seguito a danno letale al DNA, o in seguito a sua iperespressione in diversi contesti cellulari, è in grado di indurre apoptosi (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Di Stefano et al., 2004; Cecchinelli et al., 2006b; Mayo et al., 2005). Successivamente alla scoperta di questa interazione abbiamo iniziato il nostro progetto, in collaborazione con il gruppo di ricerca dell'Insubria. Come punto di partenza abbiamo confermato il legame delle due proteine in vari contesti cellulari. In particolare abbiamo espresso in cellule umane, HEK293T, usate come recipienti per la loro elevata efficienza di transfettibilità, i costrutti EGFP-HIPK2 e FLAG-MeCP2 e i relativi vettori di controllo vuoti (figura 5A). In seguito, abbiamo immunoprecipitato gli estratti cellulari con l'anticorpo anti-GFP: abbiamo, quindi, osservato la co-immunoprecipitazione di MeCP2 e HIPK2 solo quando le due proteine sono co-esprese insieme e non quando sono espresse da sole e insieme al vettore di controllo vuoto. Lo stesso esperimento lo abbiamo ripetuto, inoltre, in fibroblasti murini, da noi immortalizzati, nulli per MeCP2 (MEF MeCP2 nulle), provenienti dai topi modello della Rett; in questo caso abbiamo immunoprecipitato con l'anticorpo anti-MeCP2 e abbiamo nuovamente osservato l'interazione delle due proteine solo quando sono state trasfettate insieme (figura 5B). In aggiunta, abbiamo dimostrato questa interazione fisica anche per le proteine MeCP2 e HIPK2 endogenamente espresse nelle cellule; abbiamo, infatti, immunoprecipitato estratti di fibroblasti umani immortalizzati (HF) con l'anticorpo anti-MeCP2, o viceversa con anti-HIPK2 (figura 5C), e abbiamo avuto nuovamente conferma del legame delle due proteine nei campioni

immunoprecipitati con i suddetti anticorpi, ma non quando abbiamo immunoprecipitato con un anticorpo anti-IgG di coniglio, che abbiamo usato come controllo negativo. Questi esperimenti, quindi, ci hanno confermato l'interazione fisica della chinasi HIPK2 e la proteina MeCP2 nei vari contesti cellulari.

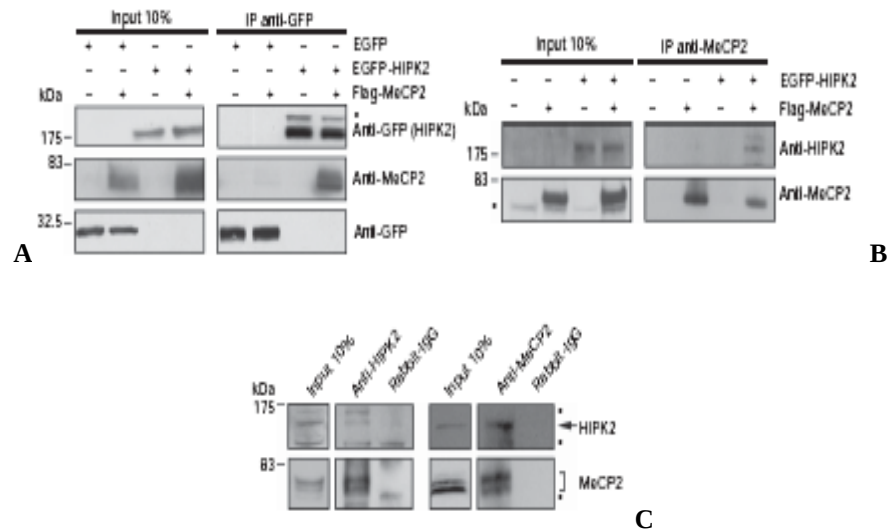


**Figura 5. HIPK2 interagisce fisicamente con MeCP2.** A: HEK293T trasfettate con EGFP-HIPK2 e FLAG-MeCP2 e i relativi vettori di controllo vuoti EGFP e FLAG. Input( estratti cellulari totali). L'anticorpo anti-GFP è stato usato per il saggio di immunoprecipitazione. B: fibroblasti murini immortalizzati nulli per MeCP2, trasfettati con EGFP-HIPK2 e FLAG-MeCP2 e vettori vuoti EGFP e FLAG e immunoprecipitati con anticorpo anti-MeCP2. C: fibroblasti umani immortalizzati HF immunoprecipitati con anti-HIPK2 (sinistra) e con anti-MeCP2 (destra) e con anti-IgG di coniglio(IgG-Rabbit) come controllo negativo: in entrambi i casi è confermato il legame delle due proteine.

## MeCP2 è fosforilata da HIPK2 *in vitro*

Nota l'attività chinastica di HIPK2, dopo aver dimostrato l'interazione fisica di quest'ultima con MeCP2, ci siamo domandati se HIPK2 fosse in grado di fosforilare la proteina. A tale scopo abbiamo condotto un saggio chinastico in cellule HEK293T. In particolare abbiamo trasfettato in queste cellule FLAG-HIPK2 selvatico (WT-HIPK2) e il suo mutante puntiforme privo dell'attività chinastica, FLAG-HIPK2-K221R (Kim et al., 2008). In seguito le proteine immunopurificate dai lisati cellulari sono state usate come fonte enzimatica in un saggio chinastico *in vitro*, insieme al substrato ricombinante MeCP2, in presenza di ( $\gamma^{33}\text{P}$ )ATP. Come atteso, WT-HIPK2 è in grado di autofosforilarsi

( D'orazi et al., 2002) e di fosforilare il substrato MeCP2, mentre non il mutante puntiforme HIPK2-K221R è privo dell'attività catalitica; la mancata fosforilazione di questo mutante suggerisce che l'incorporazione di  $P^{33}$  sia dovuta in maniera specifica ad HIPK2 (figura 6A). Dopo aver dimostrato questa fosforilazione, ci siamo domandati quale fosse la regione di MeCP2 che subisse questa modificazione chimica. Abbiamo, quindi, nuovamente effettuato un saggio chinamico *in vitro*, come precedentemente descritto, usando MeCP2 nativa e dei mutanti di delezione della proteina: un mutante privo della regione C-terminale e un secondo mutante privo della regione N-terminale. L'esperimento ha chiaramente mostrato uguali livelli di fosforilazione da parte della chinasi HIPK2 nella proteina MeCP2 nativa e nel mutante privo della regione C-terminale, mentre si ha una rilevante diminuzione di fosforilazione sul mutante privo della regione N-terminale (figura 6B). Questi dati suggeriscono che il sito o i probabili siti fosforilabili dalla chinasi HIPK2 risiedano in questa regione, in cui è presente l'MBD dominio, attraverso il quale MeCP2 contatta la cromatina metilata.

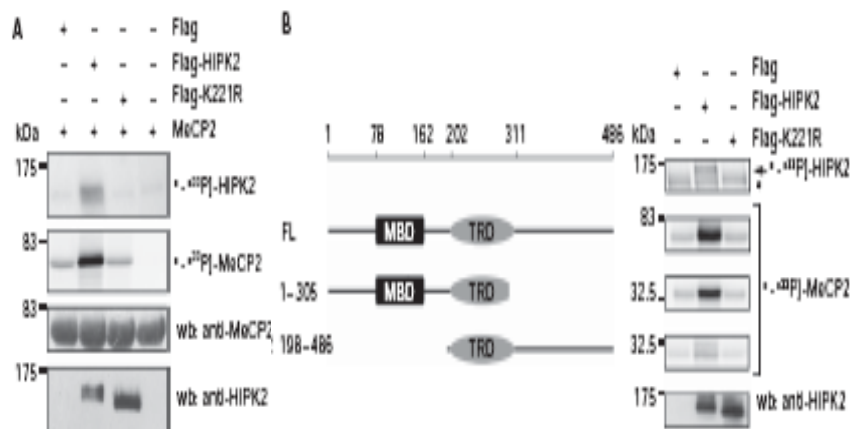


**Figura 6. HIPK2 fosforila la regione N-terminale di MeCP2 in vitro.** A: HEK293T trasfettate con FLAG-HIPK2 e FLAG-K221R (mutante puntiforme privo dell'attività catalitica) e il relativo vettore di controllo vuoto FLAG. Gli estratti cellulari sono stati immunoprecipitati con anti-FLAG e processati come di seguito: il 90% dei lisati sono stati incubati con  $\gamma$  ( $P^{33}$ ) ATP e MeCP2 ricombinante. Le proteine marcate sono state separate attraverso SDS-PAGE, trasferite su membrana di nitrocellulosa, visualizzate mediante autoradiografia e immunodecorate con l'anticorpo anti-MeCP2. Il 10% dei campioni precipitati è stato immunodecorato con l'anticorpo anti-HIPK2. Il segnale aspecifico del FLAG e del FLAG-K221R, vettori di controllo negativo, potrebbe essere dovuto ad attività aspecifica di altre chinasi coprecipitate. B: Saggio chinamico eseguito come in (A) con mutanti di delezione di MeCP2 indicati nel pannello. FL: MeCP2 nativa. 1-305: Mutante di MeCP2 privo della regione C-terminale. 198-486: Mutante di MeCP2 privo della regione N-terminale. Gli asterischi indicano le bande aspecifiche.

## **Il residuo aminoacidico serina 80 di MeCP2 è il sito specifico fosforilato da HIPK2 *in vitro* ed *in vivo***

Dopo aver dimostrato che la regione N-terminale di MeCP2 è la porzione della proteina fosforilata da HIPK2, abbiamo indirizzato la nostra analisi verso la ricerca del sito o dei siti specificatamente fosforilati dalla chinasi. Nuovamente abbiamo eseguito un saggio chinasi *in vitro*, come sopra descritto, utilizzando, in aggiunta, mutanti puntiformi di MeCP2. In particolare abbiamo usato i costrutti FLAG-MeCP2-S80, in cui è stato sostituito il residuo aminoacidico serina 80 con alanina, FLAG-MeCP2-S164A-S229A, doppio mutante in cui c'è stata una duplice sostituzione aminoacidica con alanina nelle serine 164 e 229, e il FLAG-MeCP2-S80A-S164A-S229A, triplo mutante con tutte e tre le sostituzioni aminoacidiche appena descritte. L'idea di focalizzarci su queste mutazioni puntiformi è stata sostenuta dal fatto che, attualmente, come già detto, queste risultano essere le fosforilazioni più rilevanti nello sviluppo del sistema nervoso e molto diffuse nella Sindrome di Rett. Inoltre questi sono siti cosiddetti S-T/P: infatti HIPK2 è noto avere molto spesso come bersaglio di fosforilazione le serine e le treonine fiancheggiate da residui di prolina. L'autoradiografia (figura 7A), ha chiaramente mostrato, livelli di uguale fosforilazione di MeCP2 nativa e del doppio mutante puntiforme, MeCP2-S164A-S229A, mentre ha rilevato una significativa diminuzione dei livelli di fosforilazione del triplo mutante, MeCP2-S80A-S164A-S229A, e di quando è presente il singolo mutante puntiforme MeCP2-S80A. Questi dati, quindi, indicano il sito di fosforilazione serina 80 di MeCP2 come bersaglio specifico della chinasi HIPK2.

Successivamente abbiamo dimostrato la fosforilazione nel suddetto sito *in vivo*. A tale scopo, inizialmente, abbiamo trasfettato transientemente nelle cellule HF (figura 7C) il costrutto EGFP-HIPK2 selvatico e il mutante EGFP-K221R, privo di dominio catalitico, ed il relativo vettore di controllo vuoto, EGFP; in seguito, dopo aver arricchito i lisati cellulari per MeCP2 endogena, mediante saggio di immunoprecipitazione, abbiamo valutato tramite Western blotting, l'espressione di MeCP2 fosforilata in serina 80 (MeCP2S80<sup>P</sup>) grazie all'utilizzo di un anticorpo policlonale anti-S80<sup>P</sup>. Il risultato ha mostrato un significativo aumento di MeCP2S80<sup>P</sup>, a parità di livelli proteici di MeCP2 totale immunoprecipitati in tutti i campioni, nelle cellule in cui abbiamo trasfettato HIPK2. In aggiunta, abbiamo valutato questa fosforilazione *in vivo* in un contesto neuronale; a tale scopo abbiamo utilizzato le cellule di neuroblastoma murino P19 (Latelli et al., 2001) (figura 7D), che abbiamo indotto a differenziare con acido retinoico, che neuroni corticali

primari (figura 7C), che presentano il residuo aminoacidico serina 80 costitutivamente fosforilato (Tao et al., 2009). In queste cellule abbiamo diminuito, attraverso il sistema d'interferenza dell'RNA, l'espressione endogena di HIPK2, espressione che come già dimostrato (Iacovelli et al., 2009) diminuisce solo parzialmente. I dati ottenuti mostrano una diminuzione significativa dei livelli di fosforilazione di MeCP2 in serina 80 nelle cellule in cui HIPK2 è stata interferita.

I nostri esperimenti suggeriscono, quindi, che HIPK2 è in grado di fosforilare specificamente MeCP2 *in vitro* ed *in vivo* nel suo specifico residuo aminoacidico serina 80. Inoltre, HIPK2 risulta essere la prima proteina che fosforila questo particolare sito, che, come già detto, è noto essere costitutivamente fosforilato nel sistema nervoso. Questa fosforilazione potrebbe essere fortemente correlata allo sviluppo del sistema nervoso e in particolare potrebbe essere coinvolta nella neurotrasmissione sinaptica, infatti, topi transgenici MeCP2<sup>S80A</sup> knock-in mostrano evidenti difetti locomotori (Tao et al., 2009).

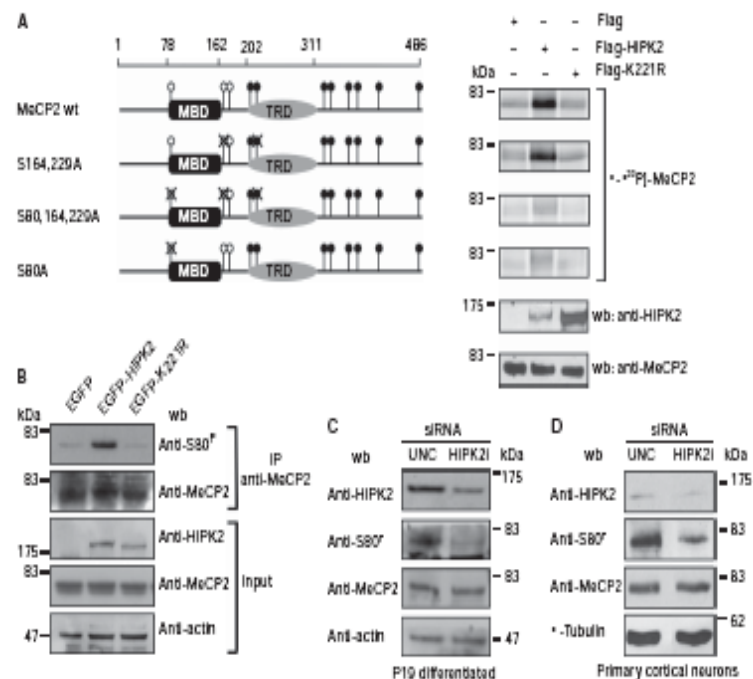


**Figura 7. MeCP2 è specificamente fosforilata da HIPK2.** A: saggio chinasi (come descritto in figura 6) con MeCP2 mutagenizzata in alanina nelle serine indicate. A destra sono mostrati l'autoradiogramma e il Western blot con gli anticorpi indicati. I pallini neri rappresentano i siti S-T/P. B: HF: fibroblasti umani trasfettati con EGFP-HIPK2 WT e EGFP-K221R, mutante privo di attività chinasi e il vettore vuoto EGFP. I campioni sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-MeCP2. Il Western blot è stato eseguito con gli anticorpi indicati. C: cellule P19, differenziate con 3uM di acido retinoico, interferite per HIPK2. D: Neuroni corticali primari interferiti per HIPK2. HIPK2i: HIPK2 interferito UNC: controllo negativo universale wb: Western blot.

## **MeCP2 e HIPK2 cooperano nell'induzione dell'apoptosi**

Dopo aver analizzato l'interazione fisica tra MeCP2 e HIPK2, ci siamo domandati quale potesse essere il conseguente ruolo biologico e funzionale indotto dall'interazione delle due proteine. Per tale motivo abbiamo espresso le due proteine, da sole o insieme, in numerosi tipi cellulari: HF, fibroblasti murini MEF e NIH3T3, cellule neuronali P19 differenziate. In particolare abbiamo trasfettato queste cellule con FLAG-MeCP2, EGFP-HIPK2 e i relativi vettori di controllo EGFP-K221R, privo di attività chinastica, FLAG e EGFP, vettori vuoti. I dati ottenuti hanno dimostrato che l'espressione di MeCP2 è in grado di indurre apoptosi, rilevata mediante saggio con trypan blue e con il saggio TUNEL. Inoltre, quando la proteina è espressa insieme ad HIPK2, l'apoptosi valutata aumenta in maniera additiva. In aggiunta, questa additività di morte cellulare sembra dipendere dall'attività catalitica di HIPK2; infatti nelle cellule in cui insieme alla proteina MeCP2 è stato trasfettato il mutante K221R, che non è in grado di indurre apoptosi, abbiamo osservato che non c'è evidenza di additività, piuttosto la morte cellulare rilevata sembra essere apoptosi indotta dalla sola MeCP2 (figura 8A e B).

La fosforilazione da parte del fattore pro-apoptotico HIPK2 e di MeCP2 ci ha fatto domandare se l'apoptosi indotta dalle due proteine potesse lavorare sulla stessa via molecolare. A tal proposito abbiamo valutato l'espressione di HIPK2 in un contesto in cui MeCP2 fosse endogenamente presente, MEFWT, ed uno in cui la proteina fosse assente, MEF nulle per MeCP2. Abbiamo, in primo luogo, trasfettato in queste cellule E-GFP-HIPK2 selvatico e il mutante EGFP-K221R, privo di capacità apoptotica, e il controllo vuoto EGFP (figura 8C). I dati ottenuti dal seguente esperimento mostrano una forte correlazione dell'attività apoptotica di HIPK2 con la presenza della proteina MeCP2 endogena; infatti, abbiamo valutato la morte cellulare indotta da HIPK2, in una finestra temporale che oscilla tra le 24 e le 72 ore, e abbiamo notato che questa è significativamente sensibile all'espressione di MeCP2. In aggiunta, quando reintroduciamo, attraverso trasfezione, MeCP2 (figura 8D) nelle cellule nulle per la proteina, abbiamo un recupero della capacità apoptotica additiva, indotta quando i due fattori sono nuovamente espressi insieme. Tuttavia, quest'additività non viene recuperata se introduciamo la proteina mutata MeCP2-R106W, che non è in grado di legare la cromatina metilata. Questo dato suggerisce, pertanto, che l'apoptosi indotta da MeCP2 necessiti del legame al DNA.

Tutti questi dati hanno trovato conferma esclusivamente in cellule immortalizzate non trasformate; infatti, quando abbiamo ripetuto gli stessi esperimenti in cellule trasformate come HeLa, RKO, U<sub>2</sub>OS e cellule spontaneamente trasformate NIH3T3, abbiamo notato che MeCP2 non è in grado di indurre apoptosi, né capace di cooperare additivamente con HIPK2 nel meccanismo di morte cellulare programmata. Questo dato suggerisce, quindi, che la differente risposta dell'espressione di MeCP2 possa essere influenzata dai meccanismi di trasformazione cellulare presenti nelle patologie tumorali.

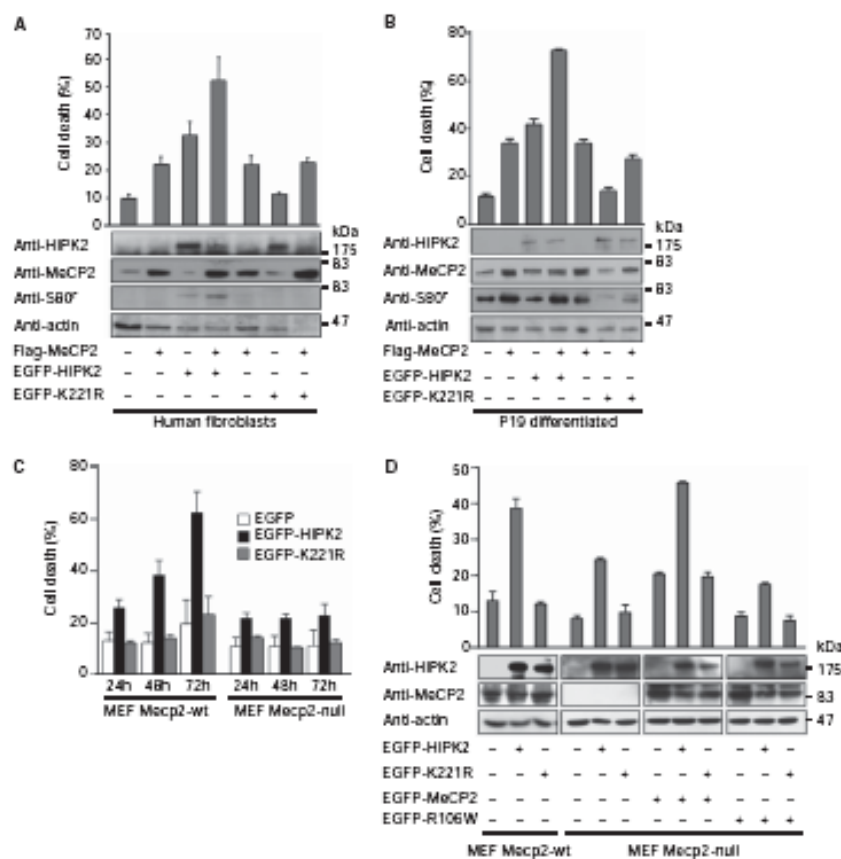


**Figura 8. MeCP2 ed HIPK2 cooperano nell'induzione dell'apoptosi.** A: HF, fibroblasti umani trasfettati con FLAG-MeCP2 insieme a EGFP-HIPK2-WT o EGFP-K221R. Il saggio con il Trypan Blue è stato effettuato 24 ore dopo la trasfezione. I WB sono stati eseguiti sui lisati totali con gli anticorpi indicati; l'anti-MeCP2<sup>S80P</sup> è stato utilizzato su immunoprecipitati per MeCP2. B: cellule P19 indotte a differenziare come in figura 7D. L'esperimento è stato eseguito come in A. C: MEF-WT e MEF nulle per MeCP2 sono state trasfettate con i plasmidi EGFP-HIPK2, EGFP-K221R e EGFP di controllo. La vitalità è stata saggiata come in A ai tempi indicati. D: MEF-WT e MEF nulle per MeCP2 sono state trasfettate con i plasmidi indicati. La vitalità è stata saggiata come in A. I WB sono stati eseguiti con gli anticorpi indicati.

## **La fosforilazione di MeCP2 nella serina 80 contribuisce all'apoptosi**

Come passo successivo del nostro progetto ci siamo domandati se la fosforilazione di MeCP2 in serina 80 potesse essere coinvolta nell'apoptosi. A tale scopo abbiamo saggiato la vitalità in MEF nulle per MeCP2 (figura 9A) e cellule neuronali P19 indotte a differenziare (figura 9B), in cui abbiamo espresso la proteina MeCP2 nativa ed alcuni suoi mutanti puntiformi (S80A, S164A, S229A, S80E) insieme ad HIPK2. I risultati ottenuti dimostrano che c'è sempre il meccanismo di morte additivo, quando le proteine sono co-espresse, ad eccezione del mutante MeCP2-S80A, incapace di esser fosforilato da HIPK2. Inoltre, questo mutante, come possiamo vedere nel sistema cellulare privo di MeCP2 (figura 9A), non è in grado di indurre apoptosi. Questi dati, quindi, suggeriscono che la fosforilazione, da parte di HIPK2, nel suddetto sito è correlata all'aumento di morte cellulare. Il mutante MeCP2-S80E, mutante che mima una fosforilazione costitutiva nella serina 80, ha mostrato possedere un alto potere apoptogeno: difatti già la sua sola espressione è paragonabile all'attivazione additiva apoptotica tipicamente rilevata quando sono espresse entrambe le proteine HIPK2 ed MeCP2. In conclusione possiamo dire che questi dati suggeriscono un coinvolgimento di MeCP2 nell'apoptosi mediata da HIPK2 che può manifestarsi dopo fosforilazione del residuo aminoacidico serina 80 della proteina legata alla Sindrome di Rett, MeCP2.

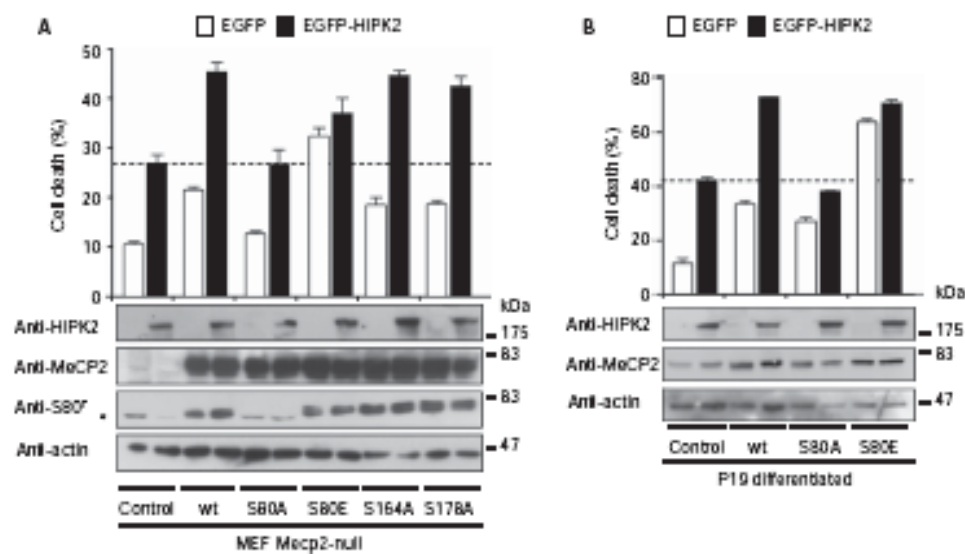


**Figura 9. La fosforilazione di MeCP2 in serina 80 contribuisce all'apoptosi.** A: MEF nulle per MeCP2 sono state trasfettate con FLAGMeCP2-WT e i relativi mutanti indicati insieme al plasmide EGFP-HIPK2 o EGFP vuoto. La vitalità tramite Trypan Blue è stata valutata 40 ore dopo la trasfezione. Il WB è stato eseguito con gli anticorpi indicati. B: cellule P19 indotte a differenziare come in figura 7D e trattate come in A. Il WB è eseguito con gli anticorpi indicati.

## DISCUSSIONE

Mutazioni della proteina MeCP2 sono state individuate nella Sindrome di Rett, una malattia rara dello sviluppo neuronale. Le forme classiche della malattia riguardano la maggior parte delle bambine colpite, mentre le forme varianti sono meno espresse, tuttavia sono anch'esse molto severe nei confronti delle pazienti colpite. Recentemente sono stati individuati altri due geni coinvolti nella Sindrome di Rett, la chinasi CDKL5, e il fattore di trascrizione FOXP1, mutati in alcune forme varianti (Mencarelli et al., 2010; Philippe et al. 2010; Sprovieri et al., 2009). Attualmente non si conoscono i meccanismi molecolari alla base del decorso della Sindrome di Rett. In aggiunta, la grande eterogeneità genotipica e fenotipica di questo disturbo neurologico apre una grande area di ricerca verso probabili partner di MeCP2 che possano chiarire il ruolo difettivo della proteina MeCP2 mutata. MeCP2, infatti, è noto essere abbondantemente espressa nel tessuto nervoso dove ne regola la maturazione (Shahbazian et al., 2002).

In questa tesi abbiamo dimostrato, dopo il saggio del doppio ibrido eseguito dal gruppo di ricerca dell'Insubria, l'interazione fisica di MeCP2 con il fattore pro-apoptotico HIPK2.

HIPK2 è una serina-treonina chinasi molto complessa sia strutturalmente che funzionalmente. La proteina, infatti, gioca ruoli diversi a seconda del contesto fisiologico (Rinaldo et al., 2007b; Calzado et al., 2007); è coinvolta, infatti, in diversi processi cellulari quali il differenziamento cellulare, la repressione trascrizionale, l'arresto del ciclo cellulare, la proliferazione e l'apoptosi. In quest'ultimo caso, è noto che HIPK2, in seguito a danno severo al DNA, si attiva e promuove i meccanismi di morte cellulare programmata attraverso vie di segnalazione sia p53-dipendenti che indipendenti.

L'interazione fisica di MeCP2 e HIPK2 è stata dimostrata sia per le proteine espresse ectopicamente che in quelle esogenamente presenti nelle cellule. Attraverso saggi di co-immunoprecipitazione abbiamo dimostrato, infatti, che le due proteine sono in grado di legarsi. In aggiunta, abbiamo dimostrato che HIPK2 è in grado di fosforilare MeCP2; questo dato suggerisce che HIPK2 è una nuova chinasi in grado di contattare e fosforilare la proteina mutata nella Sindrome di Rett, MeCP2. Infatti, fino ad ora, si conoscono solo due chinasi di cui è nota la loro capacità di fosforilare il substrato MeCP2, la proteina CDKL5 e la chinasi CaMKII/IV, che contatta il sito 421 e sembra esser coinvolta nella liberazione degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dalle vescicole sinaptiche (Zhou et al., 2006). Tuttavia queste

fosforilazioni, ad oggi, non sono ancora ben chiaramente interpretate ai fini della patogenesi della Sindrome di Rett.

Un dato molto importante dimostrato in questa tesi riguarda l'individuazione del sito di fosforilazione da parte di HIPK2 sul substrato MeCP2; infatti, attraverso l'uso di proteine delete di MeCP2, rispettivamente nelle regioni N-terminale e C-terminale, abbiamo individuato, attraverso saggio chinamico, perdita di segnale di fosforilazione quando siamo in presenza di una proteina delete della sua regione N-terminale, regione in cui è presente il dominio MBD. In questa regione, abbiamo dimostrato l'importanza del residuo aminoacidico serina 80 nella fosforilazione; infatti, a seguito di sostituzione di questa serina con alanina, perdiamo il segnale di fosforilazione da parte della chinasi HIPK2, cosa che non si verifica con mutanti in siti diversi. Questo dato, quindi, suggerisce e identifica la proteina HIPK2 come la prima chinasi che fosforila specificatamente MeCP2 nel suo residuo serina 80. Questa fosforilazione è costitutivamente espressa nel sistema nervoso (Tao et al., 2009); inoltre topi transgenici per questo sito mostrano evidenti difetti neurolocomotori. Per completezza abbiamo dimostrato, inoltre, la fosforilazione del suddetto sito anche *in vivo*: infatti neuroni differenziati e neuroni corticali primari, interferiti per HIPK2, hanno mostrato una significativa diminuzione dei livelli di serina 80 fosforilata. Questi esperimenti indicano che almeno una delle chinasi che fosforila specificatamente la serina 80 della proteina MeCP2 è HIPK2.

La mutazione della proteina MeCP2 nella serina 80 *in vivo* è molto frequente in alcuni fenotipi della Sindrome di Rett, pertanto la perdita di questa fosforilazione potrebbe contribuire alla comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia, includendo, in base ai nostri dati, un possibile ruolo giocato anche dalla chinasi HIPK2. Tra l'altro l'ipotesi che HIPK2 possa aver un ruolo nello sviluppo del sistema nervoso è fortemente suggerito dalla presenza di gravi difetti neurologici mostrata dai topi KO per la chinasi (Wiggins et al., 2004; Isono et al., 2006; Zhang et al., 2007).

La caratterizzazione biochimica dell'interazione fisica condotta in questa tesi rappresenta una prima parte di questo progetto. In futuro, un obiettivo importante sarà investigare sulle regioni di legame delle due proteine attraverso le quali riescono a contattarsi.

Scopo principale di questa tesi, è stato, inoltre, dimostrare un'attinenza biologica della nuova fosforilazione dimostrata. In particolare abbiamo effettuato saggi di trasfezione delle due proteine, ai quali hanno fatto seguito saggi di vitalità, che hanno sorprendentemente

dimostrato che l'espressione di MeCP2 può indurre apoptosi, e che questa apoptosi aumenta in maniera additiva quando viene co-espressa la proteina insieme al fattore pro-apoptotico HIPK2. Abbiamo dimostrato che questa additività, mostrata nei vari tipi cellulari da noi utilizzati, è dipendente dalla attività catalitica di HIPK2. Infatti, in presenza della proteina mutata HIPK2-K221R, priva della capacità di fosforilazione e di induzione dell'apoptosi, perdiamo il tipico effetto additivo di morte cellulare mostrato nella co-espressione delle due proteine. In aggiunta, abbiamo dimostrato una forte sensibilità dell'apoptosi indotta da HIPK2 nelle cellule prive di MeCP2. In queste cellule, infatti, in cui abbiamo espresso HIPK2, abbiamo osservato una diminuzione di vitalità rispetto alle cellule in cui MeCP2 è presente, suggerendo quindi un probabile meccanismo comune all'attivazione del processo apoptotico. Inoltre, abbiamo dimostrato, sempre nei contesti con MeCP2 nulla, un recupero dell'additività quando reintroduciamo la proteina. Tuttavia, questo non accade se viene espresso un mutante di MeCP2 che non lega la cromatina; in questo caso, infatti, MeCP2, così mutata, non è in grado di indurre apoptosi, né di cooperare additivamente con HIPK2. Ciò suggerisce che questo tipo di attività debba passare attraverso il legame al DNA. Potrebbe essere anche questa una nota importante nei difetti neuronali presenti nella malattia di Rett.

In ultimo abbiamo dimostrato esser proprio la fosforilazione nella serina 80 di MeCP2 a contribuire all'apoptosi. L'uso dei mutanti puntiformi, che sono stati scelti con criterio come possibili bersagli di HIPK2, ha infatti messo in luce il principale ruolo del residuo aminoacido serina 80 nel processo apoptotico. La proteina mutata in questa regione, infatti, non è in grado di indurre morte né di cooperare in maniera additiva con la chinasi HIPK2, cosa che invece rimane invariata in presenza degli altri mutanti saggiati, suggerendo che la sola serina 80 sia il sito chiave della risposta apoptotica.

Sorprendentemente tutti i dati ottenuti sono riproducibili esclusivamente in contesti cellulari immortalizzati non trasformati. Gli esperimenti eseguiti nelle cellule tumorali non mostrano ciò che abbiamo osservato nelle cellule non trasformate.

Nelle cellule tumorali, infatti, l'espressione di MeCP2 non è più in grado di indurre apoptosi e né di aumentarla in maniera additiva insieme ad HIPK2. Questo dato potrebbe suggerire che MeCP2 possa perdere il suo ruolo a seguito della trasformazione neoplastica e non lavorare più nel segnale apoptotico come accade nei sistemi non trasformati. Potrebbe, in aggiunta, aver un ruolo diverso in questo contesto giocando un ruolo chiave nella repressione o nella attivazione trascrizionale di particolari geni. Ad esempio, è noto

che MeCP2 nel tumore della prostata è richiesto per la crescita cellulare delle cellule trasformate (Bernard et al., 2006). Questo dato, in contrapposizione con i dati da noi ottenuti, potrebbe essere spiegato proprio in base alle probabili funzioni cellulo-specifiche che MeCP2 risulta avere.

Resta ancora oggi molto importante studiare le attività della proteina MeCP2. I nostri esperimenti, hanno messo in luce che, tuttavia, la proteina potrebbe anche avere ruoli tessuto-specifici, pertanto la rilevanza della fosforilazione nella serina 80 da parte di HIPK2, potrebbe essere non solo importante per la Sindrome di Rett ma anche per altre funzioni cellulari. Fra tutte resta chiaramente da investigare il campo della tumorigenesi. Diversi esperimenti preliminari non mostrati in questa tesi, infatti, hanno fatto presupporre che le due proteine possano avere un duplice ruolo sia nell'apoptosi che nella proliferazione cellulare.

Resta, inoltre, importante analizzare la distribuzione di HIPK2 a livello del tessuto nervoso, in cui le due funzioni biologiche indicate potrebbero entrambe aver luogo a seconda della regione analizzata. L'uso di altri mutanti, recanti sostituzioni diverse, potrebbe in qualche modo chiarire i diversi fenotipi e le diverse attività che potrebbero essere dipendenti o anche indipendenti dalla Sindrome di Rett.

## **MATERIALI E METODI**

### **Linee cellulari: colture cellulari e immortalizzazione**

Le cellule HF, MEFwt, MEF nulle per *Mecp2* (gentilmente ottenute dal Dr Adrian Bird), NIH3T3 e i neuroni corticali primari sono state tenute in coltura 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 0.05 µg/ml di streptomycin (GIBCO). Le cellule P19 sono state tenute in coltura nelle stesse condizioni ma con terreno  $\alpha$ -MEM arricchito con 7.5% di FBS e con 2.5% di Donor Calf Serum inattivato (GIBCO). Le MEFwt e le MEF nulle per *Mecp2*, provenienti da colture primarie, sono state immortalizzate con il metodo del 3T3 (Todaro e Green, 1963).

### **Differenziamento Neuronale**

Le cellule P19 sono state fatte differenziare con acido retinoico 3µM (SIGMA). Gli embryoid bodies, ottenuti al giorno 4, sono stati tripsinizzati e piastrati ( $2.5 \times 10^6$ ) in piastre pre-trattate con poly-l-lisine (SIGMA). Le cellule sono state opportunamente selezionate al giorno 5 con 1µM di ARA-C (SIGMA). I neuroni ottenuti al giorno 10 sono stati testati per Western blotting con l'anticorpo anti-neurofilamenti, prodotto e gentilmente concesso dal Dr Marco Crescenzi.

### **Vettori d'espressione e trasfezioni**

Il vettore pSG5-FLAGMeCP2 è stato precedentemente descritto (Mari et al., 2005). I mutanti S13A, S80A, S164A, S178A, S164-229A, S80A-S164A-S229A e il mutante R106W, contenenti le indicate sostituzioni aminoacidiche delle serine in alanina, sono stati prodotti per mutagenesi mediante il Quick-Change kit (Stratagene) e quindi clonati nei vettori pSG5 (Stratagene). I mutanti di delezione di MeCP2 1-305 e 198-406 sono stati già descritti (Bertani et al., 2006). I plasmidi pEGFP2 (Stratagene) e pEGFP2HIPK2 e pEGFP221R sono stati precedentemente descritti (D'orazi et al., 2002). Tutti i vettori d'espressione utilizzati sono stati trasfettati nelle cellule mediante il sistema dei liposomi (Lipofectamine Plus, Gibco).

## **Interferenza mediata da RNA**

Per l'interferenza transitoria di HIPK2 è stata utilizzata una miscela di tre differenti sequenze specifiche per HIPK2 (*HIPK2i Stealth RNAi sequenze*) e un controllo negativo universale (*Stealth RNAi Negative medium GC Duplexes*) (Invitrogen). Le cellule P19 e i neuroni corticali primari sono state trasfettate con tali siRNA, alla concentrazione di 40nM, mediante oligofectamina (RNAiMAX reagent, Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore.

## **Saggi di vitalità**

La vitalità cellulare è stata saggiata mediante la colorazione con Trypan Blue: dopo le trasfezioni sono state raccolte sia le cellule adese che fluttuanti e sono state incubate con il colorante Trypan Blue diluito 1:10 in PBS, quindi contate in opportuna camera conta-cellule. La percentuale di cellule morte è stata determinata contando 100 cellule per campo per tre volte. Il numero di cellule è stato determinato in duplicato. Il DNA apoptotico è stato saggiato anche con il sistema TUNEL (Upstate).

## **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 (pH8), 500mM NaCl, 1mM EDTA (pH8), 0.5% Sodio Deossicolato, 01% Sodio-Dodecil-Solfato (SDS), 1% Nonidet P40, con una miscela di inibitori delle proteasi e fosfatasi (Roche) ] e incubato in ghiaccio per 30 minuti. Dopo una centrifugazione di 30 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 (gentilmente fornito dal Dr M.L. Schmitz), policlonale di coniglio anti-MeCP2 (Sigma), policlonale di coniglio anti-MeCP2<sup>S80P</sup> (gentilmente fornito dal Dr M. Greenberg), monoclonale di topo anti-actina (Sigma), monoclonale di

topo anti-FLAG (Sigma), monoclonale di topo anti-GFP (Roche). L'immunoreattività è stata determinata utilizzando la reazione di chemiluminescenza *ECL Western Blotting Detection* (ECL, Enhanced-Chemilumiscence, Amersham), secondo le istruzioni del produttore e successiva autoradiografia.

## **Saggi di Co-Immunoprecipitazione**

Per la co-immunoprecipitazione delle proteine esogene EGFP-HIPK2 e FLAG-MeCP2, le cellule HEK293T e le MEF nulle per *Mecp2* sono state transientemente trasfettate con i vettori pEGFP-HIPK2 e pEGFP-C2 insieme con pFLAG-MeCP2 e pSG5-FLAG. Le cellule sono state lisate 36 ore dopo la trasfezione nel buffer di lisi [50mM Tris-HCl pH8, 300mM NaCl, 150mM KCl, 1mM DTT, 0.5% Nonidet P40, con una miscela di inibitori delle proteasi e fosfatasi (Roche)]. Dopo aver sonicato i campioni, quantitativi uguali di proteine (2mg) sono state incubate per tutta la notte con l'anticorpo anti-GFP (Roche) o l'anticorpo anti-MeCP2 (Sigma). Il giorno seguente è stato aggiunto, ad ogni campione, 50 µl di resina di agarosio 100% Proteina G (Pierce) per 3 ore in agitazione a +4°C. I campioni sono stati in seguito centrifugati, lavati 2 volte con il buffer di lisi e analizzati mediante il western blotting. Per la co-immunoprecipitazione delle proteine endogene sono state eseguite le stesse procedure nelle cellule HF in cui i campioni sono stati immunoprecipitati sia con anticorpo policlonale anti-HIPK2 (gentilmente concesso dal Dr M.L. Schimtz) , che con anticorpo policlonale anti-MeCP2(Sigma). Come controllo negativo sono state utilizzate anti-IgG di coniglio (Cappel).

## **Saggio chinasi in vitro**

Per i saggi chinasi è stata utilizzata come substrato la proteina MeCP2 ricombinante ed i relativi mutanti che sono stati descritti precedentemente (Bertani et al., 2006). Le cellule HEK293T iperesprimenti FLAG-HIPK2 o FLAG-K221R sono state immunoprecipitate ed incubate con la proteina MeCP2 ricombinante in presenza di [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP come descritto da Bertani et al., 2006. Gli immunocomplessi sono stati incubati con 1.5µg di MeCP2 ricombinante in 25µl di soluzione finale per la reazione chinasi. 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  $^{33}\text{P}$  sono state rilevate mediante autoradiografia dopo disidratazione del gel.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY.** (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 23: 185-188

**Ballestar E, Esteller M.** (2005) Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochem Cell Biol.* 83:374-384.

**Bernard D, Gill J, Dumont P, Rizzo S, Monté D, Quatannens B, Hudson D, Visakorpi T, Fuks F, de Launoit Y** (2006) The methyl- CpG-binding protein MECP2 is required for prostate cancer cell growth. *Oncogene* 25: 1358-1366

**Bertani I, Rusconi L, Bolognese F, Forlani G, Conca B, de Monte L, Badaracco G, Landsberger N, Kilstrup-Nielsen C** (2006) Functional consequence of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. *J Biol Chem* 281: 32048-32056

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

**Calzado MA, de la Vega L, Moller A, Bowtell DD, Schmitz ML** (2009) An inducible loop between HIPK2 and Siah-2 at the apex of the hypoxic response. *Nat. Cell Biol.*, 11: 85-91

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

**Chahrour M, Zoghbi HY** (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56: 422-437

**Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY** (2008) MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320: 1224-1229

**Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe AP** (1999) The methyl –CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry* 38: 7008-7018

**Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME** (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302: 885-889

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

**Dauth I, Kruger 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

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

- Di Stefano V, Blandino G, Sacchi A, Soddu S, D'Orazi G (2004b)** HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function. *Oncogene* 23: 5185-5192
- Doxakis E, Huang EJ, Davies AM (2004)** Homeodomain-interacting protein kinase-2 regulates apoptosis in developing sensory and sympathetic neurons. *Curr Biol* 14: 1761-5
- 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 (2002)** Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4: 11-19
- Gresko E, Roscic A, Ritterhoff S, Vichalkovski A, Del Sal G, Schmitz ML (2006)** Autoregulatory control of the p53 response by caspase-mediated processing of HIPK2 *Embo J* 25: 1883-1894
- Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, Rosic A, Frobius K, Kotevic I, Vichalkovski A, Hess D, Hemmings BA, Schmitz ML (2009)** PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28: 698-708
- Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A. (2007)** Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315: 1143-1147

**Hagberg B, Edström B, Oskarsson M.** (1981) The need for health care service for severely mentally retarded children with multiple handicaps. *Lakartidningen*. 78:3808-3815.

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

**Hendrich B, Bird A** (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 18: 6538-6547

**Hofmann TG, Mincheva A, Lichter P, Droge W, Schmitz ML** (2000) 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

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

**Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H** (2003) 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

**Hofmann TG, Jaffray E, Stollberg N, Hay RT, Will H** (2005) Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO1) modification *J. Biol. Chem.* 280: 29224-29232

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

**Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T.** (2004) Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. Nat Genet. 37:31-40

**Iacovelli S, Ciuffini L, Lazzari C, Bracaglia G, Rinaldo C, Prodosmo A, Bartolazzi A, Sacchi A, Soddu, S** (2009) HIPK2 is involved in cell cycle regulation and its down-regulation promotes growth arrest independently from DNA damage. Cell Prolif 42: 737-784

**Isono K, Nemoto K, Li Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H** (2006) 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

**Kawauchi S, Santos R, Kim J, Hollenbeck PL, Murray RC, Calof AL.** (2009) The role of foxg1 in the development of neural stem cells of the olfactory epithelium. Ann N Y Acad Sci. 170: 21-27

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

**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 (2003)** Characterization of cells and gene-targeted mice deficient for the p53-binding kinase homeodomain-interacting protein kinase 1 (HIPK1). *Proc.Nat Acad. Sci USA* 100: 5431-5436

**Kozinetz CA, Skender ML, MacNaughton N, Almes MJ, Schultz RJ, Percy AK, Glaze DG. (1993)** Epidemiology of Rett syndrome a population based-registry. *Pediatrics* 12: 33-36

**Kriaucionis S, Bird A (2004)** The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 32: 1818-1823

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

**Latella L, Sacco A, Pajalunga D, Tiainen M, Macera D, D' Angelo M, Felici A, Sacchi A, Crescenzi M (2001)** Recostitution of cyclin D1-associated kinase activity driver terminally differentiated cells in to the cell cycle. *Mol Cell Biol* 21: 5631-5643

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

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

**Mari F et al** (2005) CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14: 1935-1946

**Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Artuso R, Rondinella D, De Filippis R, Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rubinsztajn R, Bienvenu T, Moncla A, Chabrol B, Villard L, Krumina Z, Armstrong J, Roche A, Pineda M, Gak E, Mari F, Ariani F, Renieri A.** (2010) Novel FOXP1 mutations associated with the congenital variant of Rett syndrome. *J Med Genet.* 47:49-53

**Naidu S.** (1997) Rett syndrome: a disorder affecting early brain growth. *Ann Neurol* 42: 816

**Philippe C, Amsallem D, Francannet C, Lambert L, Saunier A, Verneau F, Jonveaux P.** (2010) Phenotypic variability in Rett syndrome associated with FOXP1 mutations in females. *J Med Genet.* 47: 59-65.

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

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

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

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

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

**Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, Landsberger N.** (2008) CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. J Biol Chem. 283: 30101-30111

**Shahbazian MD, Zoghbi HY** (2002) Rett Syndrome and MeCP2 linking epigenetics and neuronal function. J Hum Genet. 137: 1259-1272

**Sprovieri T, Conforti FL, Fiumara A, Mazzei R, Ungaro C, Citrigno L, Muglia M, Arena A, Quattrone A.** (2009) A novel mutation in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) gene associated with a severe Rett phenotype. Am J Med Genet A. 149A: 722-725.

**Tao J et al** (2009) Phosphorylation of MeCP2 at serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4882-4887

**Todaro GJ, Green H.** (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 17: 299-313

**Wakefield RI, Smith BO, Nan X, Free A, Soteriou A, Uhrin D, Bird AP, Barlow PN.** (1999) The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol.* 291: 1055-1065

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

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

**Yusufzai TM, Wolffe AP** (2000) Functional consequences of Rett syndrome mutations of human MeCP2. *Nucleic Acids Res* 28: 4172-4179

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

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

**Zhou Z et al** (2006) Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52: 255-269

## **RINGRAZIAMENTI**

A conclusione di questo percorso colgo l'occasione per poter brevemente ringraziare coloro che mi sono stati vicino e mi hanno sostenuto.

Un ringraziamento speciale va alle persone più importanti della mia vita: mio figlio Ludovico, gioia immensa e motore di ogni mia azione e mio marito Marco, punto fermo della mia vita e persona dotata di grande risolutezza che ringrazio di avermi trasmesso. Devo a loro ogni mio traguardo.

Ringrazio i miei genitori senza i quali non avrei potuto essere nulla di ciò che sono.

Ringrazio Silvia per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro e per avermi trasmesso passione e professionalità. Ringrazio il mio gruppo: Andrea, Cinzia, Francesca, Veronica ed Alice.

Ringrazio gli amici con i quali ho diviso, tra un esperimento e l'altro, gioie, momenti duri e di nuovo sorrisi, in particolare Lavinia, Marco e Rosa.

Infine ringrazio Chiara, che oltre ad essere una collega esemplare ed un'ottima amica ha rappresentato per me l'alleata più preziosa. Grazie Chiara.