

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
XXVI CICLO**

**MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELLA CHINASI HIPK2
(BIO/11)**

Tesi di dottorato di:

Dott. Veronica Gatti

Coordinatore del corso

Prof. Giorgio Prantera

Tutore

Dott. Silvia Soddu

19/06/2014

INDICE

RIASSUNTO	4
SCOPO DEL LAVORO	6
INTRODUZIONE	7
1. HIPK2	7
1.1 HIPK2 appartiene alla famiglia delle serina-treonina chinasi HIPK	7
1.2 HIPK2: dalla struttura alla funzione	9
<u>1.2.1 Dominio di interazione con le proteine omeobox</u>	10
<u>1.2.2 Regione PEST</u>	11
<u>1.2.3 Sito di sumolazione</u>	11
<u>1.2.4 Siti di ubiquitilazione</u>	12
<u>1.2.5 Dominio di autoinibizione</u>	13
<u>1.2.6 Segnali di localizzazione nucleare</u>	13
<u>1.2.7 Dominio chinasico</u>	14
<i>Il sito di legame con l'ATP.</i>	15
<i>Il sito attivo.</i>	15
<i>Il "loop di attivazione".</i>	16
1.3 Ruolo di HIPK2 nella proliferazione e nella risposta al danno al DNA: due facce di un oncosoppressore.	17
1.4 HIPK2 nei tumori	20
2. AGGREGATI PROTEICI E AGGRESOMI	22
3. SPLICING ALTERNATIVO	25
RISULTATI	28
HIPK2 è una proteina estensivamente fosforilata	28
La fosforilazione del residuo Y354 influenza la funzione di HIPK2	29
La fosforilazione della tirosina 354 è un evento autocatalitico.	30
L'auto-fosforilazione della Y354 è necessaria per l'attività serina/tronina chinasica di HIPK2.	32
La fosforilazione della Y354 impedisce l'auto-fosforilazione aberrante in Y e in S/T.	34
La fosforilazione della tirosina Y354 influenza la localizzazione subcellulare di HIPK2	37

La localizzazione citoplasmatica del mutante Y354F mostra le caratteristiche degli aggresomi e ricorda la delocalizzazione di HIPK2 osservata in alcuni tumori umani.	41
HIPK2 viene regolata mediante <i>splicing</i> alternativo	45
Gli <i>splicing</i> alternativi dell'esone 8 e dell'introne 13 si verificano in diversi tipi cellulari	48
Gli eventi di <i>splicing</i> non sono combinati e le diverse isoforme si regolano reciprocamente	49
<i>Splicing</i> alternativo e modificazioni post-traduzionali cooperano nella regolazione della localizzazione di HIPK2	51
La forma HIPK2 i13 è la più attiva nell'indurre morte cellulare	52
Tabelle	54
CONCLUSIONI	56
MATERIALI E METODI	60
BIBLIOGRAFIA	66

RIASSUNTO

La chinasi HIPK2 è stata originariamente identificata per la sua capacità di interagire con i fattori omeodominio. HIPK2 lega e fosforila un numero crescente di bersagli ed è coinvolta nella regolazione della sopravvivenza cellulare e della proliferazione durante lo sviluppo ed in risposta a danno genotossico o ipossia. In questo lavoro ci siamo focalizzati su due differenti meccanismi di regolazione dell'attività di HIPK2: la fosforilazione e lo *splicing* alternativo.

Per studiare la fosforilazione abbiamo lavorato con la proteina *full-length*. L'analisi mediante spettrometria di massa della proteina ricombinante prodotta in cellule di mammifero, eGST-HIPK2 ha permesso l'identificazione di 22 siti di fosforilazione distribuiti lungo tutti i domini della proteina. Tra questi siti, abbiamo identificato la Y354 che fa parte di una sequenza estremamente conservata nella maggior parte delle chinasi detta *loop* di attivazione. Abbiamo dimostrato che la fosforilazione della Y del *loop* di attivazione è un evento autocatalitico fondamentale per il conseguimento dell'attività chinastica, della specificità di substrato e della corretta localizzazione cellulare. Infatti, l'inibizione della fosforilazione della Y354 causa la perdita di attività chinastica sui substrati p53 e p63 e l'acquisizione di attività chinastica aberrante su se stessa. L'auto-fosforilazione fuori bersaglio induce una forte delocalizzazione citoplasmatica e la formazione di aggregati proteici che ricordano le osservazioni ottenute mediante immunoistochimica su diversi tumori umani.

Sebbene ipotizzata da tempo, la presenza di isoforme diverse di HIPK2 non è stata verificata sistematicamente. In questo lavoro abbiamo mostrato che il gene *HIPK2* umano è soggetto a regolazione mediante *splicing* alternativo e che trascrive, oltre al messaggero *full length*, almeno altre due isoforme differenti. Un'isoforma perde parte dell'esone 8 (Δ e8) che codifica per una porzione del dominio di interazione per le proteine omeobox; l'altra isoforma mantiene l'introne 13 (i13) che contiene un codone di stop prematuro che causa la perdita della parte C-terminale della proteina. Abbiamo mostrato che i livelli di messaggero di ciascuna isoforma sono strettamente dipendenti dai livelli delle altre suggerendo l'esistenza di una regolazione complessa. A questa variabilità si aggiunge un ulteriore livello di complessità dato dalla diversa regolazione mediante modificazioni post-traduzionali. Infatti, esperimenti di Western blot su estratti nucleari e citoplasmatici, suggeriscono l'esistenza di almeno due diverse forme di proteine *full-length*, una caratterizzata da un pattern di modificazioni post-traduzionali tale da farla localizzare preferenzialmente nel nucleo ed una esclusivamente nel citoplasma. Inoltre, abbiamo osservato

anche l'esistenza di un'isoforma $\Delta e8$ con una localizzazione esclusivamente nucleare nelle cellule normali che viene parzialmente delocalizzata nel citoplasma in cellule tumorali. Esperimenti funzionali preliminari, suggeriscono che le isoforme di HIPK2 potrebbero avere funzioni differenti, come descritto anche per altri oncosoppressori. In particolare è emerso che la forma i13 è la più attiva nell'induzione di morte cellulare.

SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro ci siamo proposti di studiare in maniera approfondita due dei meccanismi alla base della regolazione dell'attività della chinasi HIPK2: la fosforilazione e lo *splicing* alternativo. La scelta di un meccanismo post-traduzionale come la fosforilazione e di uno post-trascrizionale come lo *splicing* alternativo sono stati empiricamente dettati dalle osservazioni, nostre e di altri gruppi, di una potente attività di auto-fosforilazione di HIPK2 e dalla presenza di diverse bande specifiche in saggi di Western-blot, il cui significato è largamente ignoto.

INTRODUZIONE

1. HIPK2

1.1 HIPK2 appartiene alla famiglia delle serina-treonina chinasi HIPK

La proteina HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2) fa parte della famiglia delle serina treonina chinasi HIPK, cui appartengono altri tre membri: HIPK1, HIPK3 e HIPK4. HIPK1, HIPK2 e HIPK3 sono stati originariamente identificati come corepressori per fattori trascrizionali omeodominio. Sono state isolate mediante saggio del doppio ibrido in lievito da genoteche di cDNA di embrioni di topo, utilizzando come esca una porzione dell'omeoproteina murina Nkx-1.2 (Kim et al., 1998). HIPK4, quarto membro meno conservato e a tutt'oggi meno studiato della famiglia HIPK, è stato identificato attraverso analisi computerizzate delle sequenze ottenute mediante la decifrazione del genoma umano (Manning et al., 2002). Tali analisi hanno rivelato la presenza di una sequenza codificante in cui è presente il motivo catalitico proprio delle altre tre proteine chinasi (Fig. 1).

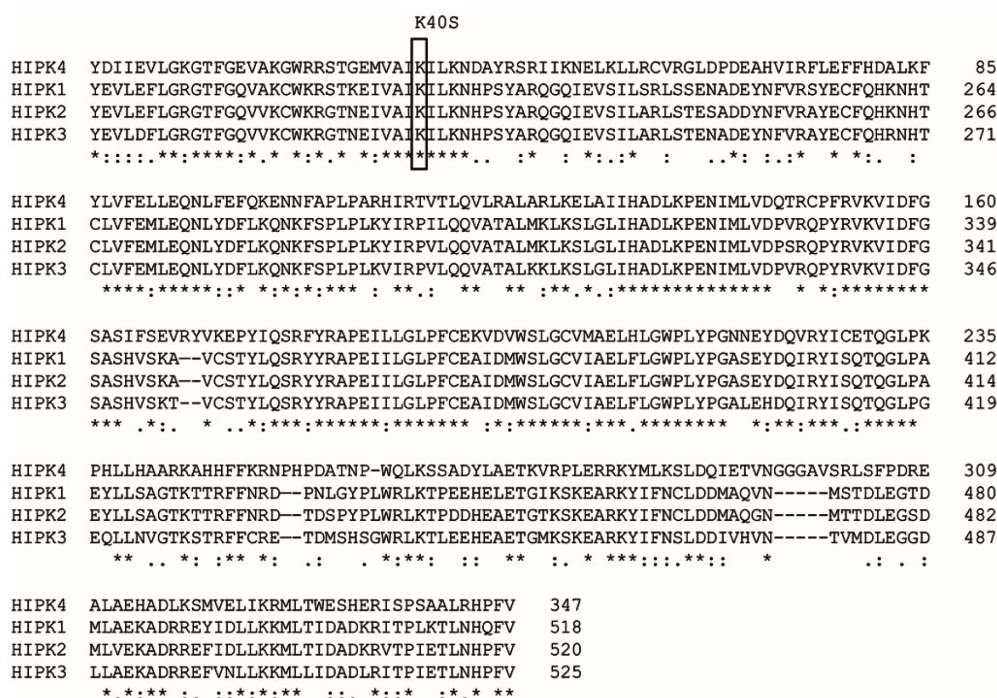


Figura 1. La famiglia delle serina-treonina chinasi HIPK. Allineamento del dominio chinasi dei quattro membri della famiglia HIPK eseguito con il programma MAFFT. I simboli (*), (:) e (.) indicano rispettivamente amminoacidi identici, molto simili e simili. Nel riquadro è segnalata la lisina conservata del sito attivo (da Arai et al., 2007).

I primi tre componenti della famiglia condividono la stessa struttura proteica costituita da un dominio chinamico N-terminale, dal dominio di interazione con i fattori trascrizionali omeobox, da una regione PEST e da un dominio C-terminale ricco di istidine e tirosine (Kim et al., 1998).

HIPK1, HIPK2 e HIPK3 mostrano una struttura primaria molto conservata con una similarità di circa il 90% nel dominio chinamico, il 70% nel dominio di interazione e il 65% nella regione C-terminale ricca di tirosine e istidine (Kim et al., 1998) (Figura 2).

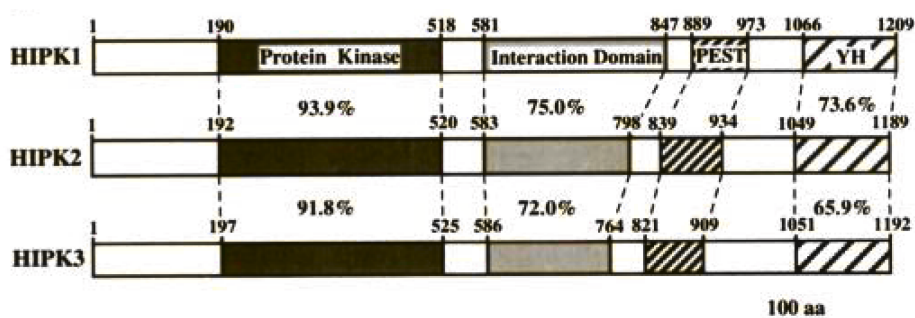


Figura 2. Conservazione della struttura primaria delle proteine HIPK. Rappresentazione schematica della struttura in domini. È indicata la percentuale di similarità di ciascun dominio rispetto ad HIPK2 (da Kim et al., 1998).

L'elevata similarità di sequenza che contraddistingue le tre chinasi suggerisce l'esistenza di ridondanza funzionale. Ciò sembra confermato dal fenotipo dei topi knock-out (KO). Infatti, mentre i singoli topi KO sono grossolanamente normali, i doppi KO *hipk1* e *hipk2* muoiono prima della nascita, mostrando varie anomalie che includono difetti ematopoietici e nella formazione dei vasi sanguigni (Calzado et al., 2007; Rinaldo et al., 2007b).

Successive ricerche in banca dati hanno rivelato che l'intera sequenza di HIPK2, il membro più studiato della famiglia, è altamente conservata nei vertebrati e mostra significativa similarità con le chinasi umane DYRK/MNB, minibrain e PKY e con la chinasi murina MJAK, mentre il dominio chinamico è stato anche riscontrato in *Drosophila Melanogaster* e in *Caenorhabditis Elegans*. Ciò permette di inserire HIPK2 nella sottofamiglia delle chinasi DYRK (Dual-specificity tyrosine (Y)-phosphorylation- Regulated Kinase) (Hofmann et al., 2000) (Fig 3).


```

Minibrain (human)      RYEIDSLIGKGSFGQVVKAYDRVEQEWVAIKIKNKKAFNLQAQIEVRLLELM 210
Minibrain (Drosophila) RYEIDSLIGKGSFGQVVKAYDHEEQCHVAIKIKNKKPFLNQAQIEVKLLEMM 150
HIPK2 (human)         TYEVLEFLGRGTFGQVVKCWRGTNEIVAIIKILKNHPSYARQQQIEVSILARL 243
MYAK (mouse)          SYEVLEFLGRGTFGQVAKCWRSTKEIVAIIKILKNHPSYARQQQIEVSILSRL 241
PKY (human)           TYEVLDFLGRGTFGQVVKCWRGTNEIVAIIKILKNHPSYARQQQIEVSILARL 248
DyrK/MNB (human)      RYEVLVKVGKGSFGQVVKAYDHKVHQAVALKMVRNEKRFHRQAABEIRILEHL 273
YAK1 (yeast)          KYLVLDILGQGTFGQVVKCNLLTKEILAVKVVKSRTYLTQSITEAKILELL 420
YAKA (Dictyostelium)  KYKVLDSLQGTFGQVVKCNCDTDELVAIIKILKNQAYFQQGRLEILSLKSL 256
      * : . : * : * : * : * : . : . : * : * : * : * : . : . :

NK-HDTEMKYYIVHLKRHFMRNHLCLVFEMLSYNLYDLLRNTNFRGVSLNLRKFAQQM 269
NR-ADAENKYYIVKLKRHFMRNHLCLVFELLSYNLYDLLRNTNFRGVSLNLRKFAQQM 209
S--TESADDYNFVRAYECFQHKHNTCLVFEMLEQNLYDFLKQNKFSPLPKYIRPVLQQV 301
S--SENADEYNFVRSYECFQHKHNTCLVFEMLEQNLYDFLKQNKFSPLPKYIRPVLQQV 299
S--TENADEYNFVRAYECFQHRNHTCLVFEMLEQNLYDFLKQNKFSPLPKYIRPVLQQV 306
RK-QDKDNTMNVIHMLENFTFRNHICMTFELLSMNLYELIKKNKFGQFSPLVRKFAHSI 332
NQKIDPTNKHHLRMYDSFVHKHNLCLVFELLSNNLYELIKKNKFGHLSIQLIRTFTTQI 480
NDQHPEDKNHILRLDLSFILKMHLCIVFELLSVNLPELIKQNNFRGLSTNLKVFLLIQI 316
      : . : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : . : . :

CTALLFLATPELSIIHCDLKPENILLCNPKRS--AIKIVDFGSSCQLGQRIY-QYIQSRF 326
CTALLFLSTPELSIIHCDLKPENILLCNPKRS--AIKIVDFGSSCQLGQRIY-HYIQSRF 266
ATALMKLKS--LGLIHADLKPENIMLVDPSPYRVKVIDFGSASHVSKAVCSTYLSQRY 359
ATALMKLKS--LGLIHADLKPENIMLVDPVQPYRVKVIDFGSASHVSKAVCSTYLSQRY 357
ATALMKLKS--LGLIHADLKPENIMLVDPVQPYRVKVIDFGSASHVSKAVCSTYLSQRY 364
LQCLDALHKN--RIIHCDLKPENILLKQQGRS--GIKVIDFGSSCYEHQRYV-TYIQSRF 387
LDSLCLVKES--KLIIHCDLKPENILLCAPDKP--ELKIIDFGSSCEEARTVY-TYIQSRF 535
LDALIVLAN--ANIIHCDLKPENILLQNVNSP--AIKIIDFGSACYEKSTLY-TYIQSRH 371
      . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

YRSPEVLLGMPYDLAIDMWSLGCILVEMHTGEPLFGSGANEVDQMNKIVEVLGIPPAHILD 386
YRSPEVLLGIQYDLAIDMWSLGCILVEMHTGEPLFGSGANEVDQMNKIVEVLGMPPKYLLD 326
YRAPEIILGLPFCEAIDMWSLGCIVIAELFLGWPLYPGASEYDQIRYISQTQGLPAEYLLS 419
YRAPEIILGLPFCEAIDMWSLGCIVIAELFLGWPLYPGASEYDQIRYISQTQGLPAEYLLS 417
YRAPEIILGLPFCEAIDMWSLGCIVIAELFLGWPLYPGALEYDQIRYISQTQGLPGEQLLN 424
YRAPEVILGARYGMPIDMWSLGCILAEILLTGYPPLPGEDEGDLACMIELLGMPSQKLLD 447
YRAPEIILGIPYSTSIDMWSLGCIVIAELFLGIPFGASEYNQLTRIIDLTYGPPSWMID 595
YRSPEVLVGTVCASIDMWSLGCISAEFLGLPLFPGNSEYNQISRIVEMRGIFPSDLLD 431
      ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 3. Conservazione del dominio catalitico. Allineamento delle sequenze del dominio catalitico delle proteine indicate effettuato mediante il programma Clustalw. Gli amminoacidi identici sono contrassegnati con gli asterischi e quelli simili con i puntini. La lisina conservata del sito attivo e la tirosina del *loop* di attivazione sono mostrate in grassetto (da Hofmann et al., 2000).

Le DYRK sono una famiglia di chinasi evolutivamente conservate lontanamente correlate alle MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ed alle CDKs (cyclin-dependent protein kinases). Tutte le DYRK si autofosforilano su un residuo di tirosina contenuto nel *loop* di attivazione del dominio chinasi e fosforilano i loro substrati su serine e treonine (Aranda et al., 2011).

1.2 HIPK2: dalla struttura alla funzione

L'HIPK2 murina è una proteina di 1189 amminoacidi; partendo dall'estremità ammino-terminale fino alla carbossi-terminale sono individuabili le seguenti strutture (Fig. 4):

- un sito di sumolazione
- un domino chinasi
- un dominio per l'interazione con le proteine omeobox, (HID, homeobox interacting domain)
- una regione contenente due sequenze PEST
- una regione con un segnale di ritenzione negli *speckle* nucleari

- un dominio putativo di autoinibizione
- un sito di ubiquitilazione

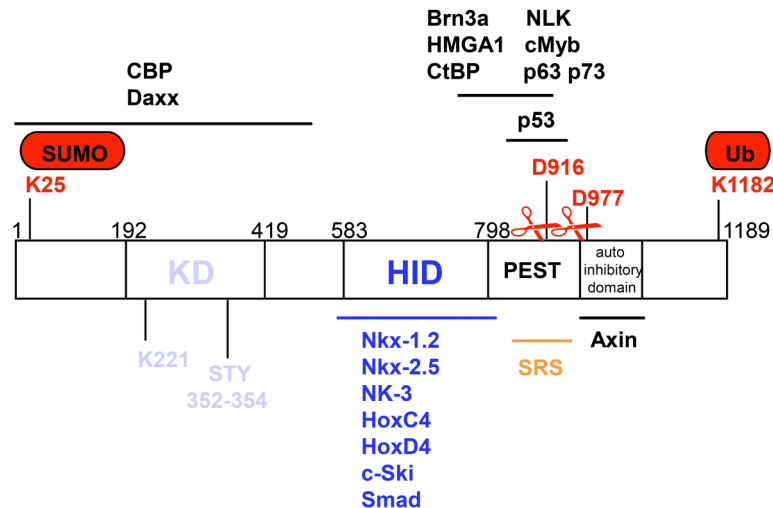


Figura 4. Rappresentazione schematica della proteina HIPK2 murina. Le linee orizzontali al di fuori dei riquadri mostrano le regioni coinvolte nel legame dei partner proteici indicati. K25 indica il sito di sumolazione, KD il dominio chinasi al cui interno K221 è la lisina del sito catalitico e STY il sito regolativo putativo. HID indica il dominio di interazione con le proteine omeobox, PEST la regione contenente le sequenze PEST, D916 e D977 i siti di taglio delle caspasi (indicati dalle forbici), SRS il segnale di ritenzione negli *speckle* e K1182 il sito di ubiquitilazione (Rinaldo et al., 2007a).

1.2.1 Dominio di interazione con le proteine omeobox

HIPK2 è stata isolata mediante un saggio del doppio ibrido per la sua capacità di legare l'omeoproteina murina Nkx-1.2. L'analisi dei cloni positivi per questo saggio ha rivelato la presenza di un dominio di interazione con le proteine omeobox (HID in fig. 4) altamente conservato nella sottofamiglia HIPK. Inoltre è stato dimostrato che le proteine HIPK interagiscono anche con altri fattori della famiglia NK e della famiglia HOX. È stata studiata in dettaglio l'interazione con il fattore 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 Groucho 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. Questi fattori sono coinvolti nella via di trasduzione del segnale innescata dal TGF β (transforming growth factor- β), BMP (bone morphogenetic protein) e attivina.

HIPK2, insieme a c-sky, gioca un ruolo importante nella regolazione negativa dell'attivazione trascrizionale indotta dalle suddette vie di segnalazione (Harada et al., 2003).

1.2.2 Regione PEST

In generale le regioni PEST funzionano come segnali per la degradazione proteolitica attraverso il proteasoma 26S. La sequenza amminoacidica della maggior parte delle proteine a rapida degradazione contiene una regione idrofilica ricca in prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T) che probabilmente forma un *loop* esposto al solvente sulla superficie dell'enzima. Delezioni naturali o prodotte sperimentalmente di tali regioni PEST generalmente provocano un aumento della stabilità metabolica del prodotto troncato. Inoltre, la fusione della sequenza PEST su proteine metabolicamente stabili provoca la rapida degradazione delle chimere (Rechsteiner et al., 1996). In HIPK2 la regione PEST non sembra essere coinvolta nella degradazione proteolitica, ma al contrario la regione PEST media l'interazione con la maggior parte dei fattori non oncotici che legano HIPK2, tra questi il soppressore tumorale p53. Ciò è dimostrato dal fatto che il mutante HIPK2 Δ 853-955, contenente una delezione all'interno di tale regione, perde la capacità di interagire con la suddetta proteina (D'Orazi et al., 2002).

1.2.3 Sito di sumolazione

Le regioni N- e C-terminali di HIPK2 sono bersaglio di sumolazione e ubiquitilazione. La sumolazione consiste nell'aggiunta di un polipeptide di 97 amminoacidi detto SUMO (Small Ubiquitin-Related Modifier) su di una lisina facente parte della sequenza consenso (I/L/V/F) KXE. È stato dimostrato che in HIPK2 la lisina cui viene coniugato il peptide SUMO si trova all'estremità ammino-terminale, in particolare in posizione 25 e che l'enzima responsabile è la E3 SUMO ligasi Pc2 (Rosic et al., 2006). Questo sito di sumolazione è estremamente conservato sia evolutivamente sia all'interno della famiglia HIPK (Gresko et al., 2005, Hofmann et al., 2005). I possibili effetti della sumolazione sulle proteine bersaglio vanno dalla stabilizzazione ad una diversa localizzazione subcellulare, a cambiamenti nell'attività e nella funzione. La mutazione K25R che impedisce la coniugazione del peptide SUMO su HIPK2 sembra aumentare la stabilità della proteina mentre non influenza la capacità di mediare l'attivazione di p53 e l'apoptosi (Gresko et al., 2005). In seguito a danno al DNA, HIPK2 fosforila la E3 SUMO ligasi Pc2 che a sua volta provoca la sumolazione di HIPK2. Questo circuito a feedback positivo accresce la capacità di HIPK2 di agire come repressore trascrizionale. Al contrario la sumolazione di HIPK2 regola negativamente la sua funzione effettrice sull'attivazione della via di segnalazione di JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) indotta dal TGF β e l'apoptosi indipendente da p53. Inoltre, contrariamente a quanto accade per PML e CtBP, la

coniugazione con SUMO non influenza la localizzazione subcellulare di HIPK2 (Hofmann et al., 2005).

1.2.4 Siti di ubiquitilazione

L'ubiquitilazione consiste nel legame covalente di una piccola proteina di 76 amminoacidi, detta ubiquitina, ad una specifica lisina di una proteina. Questa reazione è catalizzata da una classe di enzimi chiamati ubiquitina ligasi che possono anche agire su una lisina dell'ubiquitina stessa producendo catene di poli-ubiquitina. Questa modificazione post-traduzionale generalmente indirizza la proteina bersaglio alla degradazione proteolitica mediata da un complesso multiproteico detto proteasoma. Uno degli enzimi responsabili dell'ubiquitilazione di HIPK2 è la E3 ubiquitina ligasi MDM2. La costruzione di una serie di mutanti con varie delezioni ha permesso di dimostrare che la lisina bersaglio di ubiquitilazione è quella in posizione 1182 che, al contrario di quanto si poteva supporre, si trova al di fuori della regione PEST. La sostituzione di tale lisina con un'arginina provoca una forte riduzione della degradazione di HIPK2 senza alterare la sua capacità di legame a MDM2 escludendo che tale evento possa dipendere da una mancata interazione tra le due proteine (Rinaldo et al., 2007a). Evidenze sperimentali mostrano che HIPK2, in seguito a danno subletale, viene indirizzata alla degradazione proteolitica conseguente alla poli-ubiquitilazione catalizzata dall'enzima E3 ubiquitina ligasi MDM2. In queste condizioni non viene attivata la funzione pro-apoptotica di p53 che invece agisce inducendo arresto proliferativo. In risposta a danno al DNA letale, l'estremità C-terminale contenente il sito di ubiquitilazione di HIPK2 viene rimossa grazie a taglio caspatico. HIPK2, non più degradabile, è stabilizzata e attiva l'apoptosi dipendente e indipendente da p53. A conferma del meccanismo, è stato dimostrato che il mutante K1182R, resistente alla degradazione, possiede una maggiore attività pro-apoptotica (Rinaldo et al., 2007 a). Recentemente è stato dimostrato che HIPK2 viene ubiquitilata anche dalle E3 ubiquitina ligasi Siah1 e Siah2. In cellule non sottoposte a stress, HIPK2 forma un complesso con Siah1 e viene ubiquitilata e indirizzata alla degradazione via proteasoma. Al contrario, in risposta a danno genotossico, la fosforilazione di Siah1 catalizzata da ATM e/o ATR, inducendo la distruzione del complesso Siah1-HIPK2, media la stabilizzazione di HIPK2 (Winter et al., 2008). L'interazione tra HIPK2 e Siah2 è invece coinvolta nella regolazione della risposta all'ipossia. In condizioni di normossia solo una frazione del pool di molecole di HIPK2 è legata a Siah2 e, di queste, una parte è ubiquitilata e indirizzata alla degradazione via proteasoma mentre una parte sfugge all'ubiquitilazione in quanto la stessa HIPK2, fosforilando Siah2, indebolisce il legame e diminuisce la stabilità di Siah2. Al contrario, in condizioni di ipossia, l'induzione di Siah2 comporta

un marcato aumento della frazione di molecole di HIPK2 legate a questa ubiquitina ligasi con conseguente aumento di ubiquitilazione e degradazione di HIPK2 (Calzado et al., 2009).

1.2.5 Dominio di autoinibizione

L'esistenza di un dominio a carattere auto-inibitorio è stata dimostrata nel corso di studi volti a caratterizzare il ruolo funzionale dell'interazione tra HIPK2 e la proteina axina. Quest'ultima sembra avere un ruolo duplice; in primo luogo, mediando la formazione di un complesso trimetrico, facilita la fosforilazione di p53 da parte di HIPK2 e stimola la trascrizione dei geni pro-apoptotici bersaglio di p53; in secondo luogo, il legame di axina a HIPK2 sembrerebbe sequestrare un dominio auto-inibitorio che altrimenti interferirebbe con il dominio chinasi causandone la perdita dell'attività enzimatica. Questa ipotesi è supportata dal fatto che la delezione del dominio di HIPK2 responsabile dell'interazione con l'axina (amminoacidi 935–1050) dà origine ad un mutante che stimola l'attivazione di p53 in modo più efficace di quanto non faccia la proteina nativa HIPK2 (Rui et al., 2004). Il ruolo auto-inibitorio di questa regione è confermato dall'esistenza di due forme tronche di HIPK2 che mostrano una maggiore capacità di indurre la fosforilazione di p53 e l'apoptosi rispetto alla forma intera. Queste due varianti sono generate da caspasi che catalizzano la rimozione dell'estremità carbossi-terminale e di conseguenza del dominio auto-inibitorio mediante taglio proteolitico in corrispondenza dei residui amminoacidici 916 e 977 (Gresko et al., 2006).

1.2.6 Segnali di localizzazione nucleare

Nelle cellule non tumorali, la maggior parte di HIPK2 è localizzata nel nucleo in peculiari strutture puntiformi, non delimitate da membrana, dette nuclear speckles e solo una piccola frazione ha una localizzazione citoplasmatica. Una serie di delezioni a partire dall'estremità carbossi-terminale di HIPK2 ha permesso di identificare una regione specifica (amminoacidi 860-967) necessaria per la localizzazione nei nuclear speckles detta SRS (speckle-retention signal). Sebbene la rimozione di questa regione impedisca il posizionamento di HIPK2 nei suddetti compartimenti subnucleari, non interferisce con la presenza nucleare, indicando l'esistenza di segnali di localizzazione nucleare distinti dalla regione SRS, forse costituiti dagli amminoacidi 97-157 (NLS1) e 780-840 (NLS2). Un terzo segnale di localizzazione nucleare sembra essere presente all'interno della regione SRS che anche da sola assicura la distribuzione nei nuclear speckles. (Kim et al., 1999). Attualmente, si ritiene che HIPK2 e la sua omologa HIPK3 co-localizzino in una nuova classe di speckles subnucleari detti domini HIPK i quali si sovrappongono parzialmente ai nuclear bodies (NB), e ai polycomb group bodies (PcG). I NB contengono molti regolatori della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e della stabilità genomica come PML, SP100, p53 e CBP

mentre PcG bodies giocano un ruolo importante nel mantenimento epigenetico dello stato represso dei geni (Rinaldo et al 2008). La co-localizzazione di HIPK2 con PML e p53 nei NB è importante per la funzione pro-apoptotica di HIPK2. E' stato dimostrato che l'isoforma PML IV interagisce sia con HIPK2 sia con p53 ed è necessaria per la fosforilazione di p53 in serina 46 e per l'attivazione della trascrizione p53-dipendente (Moller et al., 2003). Dati recenti indicano che HIPK2 lega e co-localizza con la SUMO-ligasi PC2 e che parte dei domini HIPK corrispondono ai PcG bodies. Per la formazione di questo sottogruppo di domini HIPK è necessario che HIPK2 sia cataliticamente attiva e sumolata. È stato proposto che, in seguito a danno al DNA, HIPK2 fosforili PC2 aumentando la capacità di quest'ultima di sumolare se stessa ed HIPK2. Tale sumolazione di HIPK2 aumenterebbe a sua volta la capacità di HIPK2 di agire come repressore trascrizionale (Roscic et al., 2006).

1.2.7 Dominio chinasico

I domini catalitici delle proteine chinasi non sono conservati uniformemente, ma consistono di regioni alternate di bassa e alta conservazione. Dall'allineamento di 65 membri della famiglia delle proteine chinasi sono evidenti undici principali subdomini conservati, separati da regioni a minore conservazione nelle quali cadono le delezioni e le inserzioni più lunghe (Hanks et al., 1988). Una tale distribuzione alternata di regioni a bassa e alta conservazione è una caratteristica comune nelle proteine globulari omologhe e dà indicazioni circa la struttura di ordine superiore. Infatti, i subdomini conservati devono essere importanti per la funzione catalitica o direttamente come componenti del sito attivo o indirettamente contribuendo alla formazione del sito attivo attraverso vincoli imposti sulla struttura secondaria. Al contrario le regioni non conservate probabilmente si trovano in *loop* di collegamento (Hanks et al., 1988). I domini chinasici di p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) umana, DYRK2 di *Drosophila Melanogaster* e HIPK2 murina mostrano subdomini altamente conservati (fig. 5). Basandosi sulla conservazione del dominio chinasico e sulla struttura cristallografica di p38 MAPK si possono dedurre alcune importanti caratteristiche strutturali e funzionali delle DYRK e della stessa HIPK2.

```

sp|Q9QZR5|HIPK2_MOUSE      SMTNTYEVLEFLGRGTFGQVVKCWRGTNEIVAIAIKILKNHPSYARQGQIE
sp|Q9V3D5|DYRK2_DROME      FR---YEILEVIGKGSFGQVIRALDHKTNTHTVAIKIIRNKKRFLNQAVVE
sp|Q16539|MK14_HUMAN       -----LSPVGSAGYGSVCAAFDTKTGLRVAVKKLSRPFQSIHAKRT
                             *. :* *::*. * . . *. **:* : . :.

sp|Q9QZR5|HIPK2_MOUSE      VSILARLSTESAD-DYNFVRAYECFQHKNHTCLVFEMLEQNLYDFLKQNK
sp|Q9V3D5|DYRK2_DROME      LNILDELREKDADGSHNVIHMLDYTYFRKHLCTFELMSLNLYELIKKN
sp|Q16539|MK14_HUMAN       YRELRLLLKHKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVK
                             * * . : .:: :. :. : : : :

sp|Q9QZR5|HIPK2_MOUSE      FSPLPLKYIRPVLQQVATALMKLKSGLIHADLKPENIMLVDPSPQPYRV
sp|Q9V3D5|DYRK2_DROME      YNGFSMSLIRRFCNSIVKCLRLLYKENIIHCDLKPENILLK--QRGSSSI
sp|Q16539|MK14_HUMAN       CQKLTDDHVQFLIYQILRGLKYIHSADIIHRDLKPSNLAVN----EDCEL
                             . :. . :. . . : * : . . : ** ***** : :

sp|Q9QZR5|HIPK2_MOUSE      KVIDFGSASHVSKAVCSTYLSRYRAPEIILG-LPFCEAIDMWSLGCVI
sp|Q9V3D5|DYRK2_DROME      KVIDFGSSCYVDRKIY-TYIQSRFYRSPEVILG-LQYGTAIMWSLGCIL
sp|Q16539|MK14_HUMAN       KILDFGLARHTDDEMTG-YVATRWYRAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIM
                             *::** : :.. : * : :*:**::*. : : : :*:**::*:

sp|Q9QZR5|HIPK2_MOUSE      AELFLGWPLYPGASEYDQIRYISQTQGLPAEYLLSAGTKTTRFFNRDTS
sp|Q9V3D5|DYRK2_DROME      AELYTGFPFLPGENEVEQLACIMEVLGLPPKVLISVARRRRLFFD-----
sp|Q16539|MK14_HUMAN       AELLTGRTLFPGTDHIDQLKLILRLVGTPGAELLKKIS-----
                             *** * .*:** .. :*: * . * * *:.

```

Figura 5. Allineamento delle sequenze del dominio catalitico delle proteine indicate effettuato mediante il programma Clustalw. Gli amminoacidi identici sono contrassegnati con gli asterischi e quelli simili con i puntini.

Il sito di legame con l'ATP.

Nel subdominio I del dominio catalitico delle chinasi si trova il dominio responsabile del legame con l'ATP. La sequenza consensus G-X-G-X-X-G-X-V. (G-R-G-T-F-G-Q-V in HIPK2) forma una struttura a foglietto β , giro, foglietto β , dotata di elevata flessibilità conformazionale che sembra servire come ancora per il gruppo fosforilico evitando al contempo contatti sterici con l'ATP. Alcuni dei residui di questa sequenza, insieme alla lisina conservata del sito catalitico e ad altri residui conservati nei subdomini V, VI e VII sono coinvolti nella formazione e nella stabilizzazione del legame con l'ATP.

Il sito attivo.

Ci sono numerose evidenze che lasciano supporre che la lisina conservata nel subdominio II e l'acido aspartico conservato nel subdominio VII giochino un ruolo critico nel meccanismo fosfotransferasico della reazione chinasica. In p38 MAPK la sostituzione dei residui catalitici lisina 53 con arginina (K53R) e acido aspartico 168 con alanina (D168A) risultano in una perdita dell'attività chinasica (Kumar et al., 1995). Lo stesso avviene in DYRK2 di *Drosophyla* mutando la lisina 227 in metionina (K227M) e l'acido aspartico 324 in alanina (D324A) (Lochhead et al., 2005) e nella DYRK1A umana in cui la lisina 188 è sostituita con un'arginina (K188R) (Kentrup et al., 1996).

Dagli allineamenti di sequenza mostrati in figura 5 è evidente che in HIPK2 sono conservati sia la lisina che l'acido aspartico del sito catalitico, rispettivamente i residui K221 e D317. Ad oggi, il

coinvolgimento dell'acido aspartico nella reazione fosfotransferasica di HIPK2 non è stato ancora indagato. Al contrario, l'importanza del K221 è stata evidenziata mediante la sostituzione con un'arginina (o un'alanina) che portano ad una perdita della attività chinasi. Il mutante K221R non è infatti in grado né di fosforilare in modo efficiente le proteine bersaglio come la proteina basica della mielina (Kim et al., 1998) e p53, né di auto-fosforilarsi (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). Una conferma del coinvolgimento del K221 nel meccanismo catalitico e del fatto che la sostituzione con arginina sia responsabile esclusivamente della perdita dell'attività enzimatica viene dalla dimostrazione che HIPK2, nella sua forma K221R cataliticamente inattiva (kinase dead, KD) è ancora in grado di legare in modo efficiente il suo bersaglio di fosforilazione p53 (D'Orazi et al., 2002).

Il "loop di attivazione".

Il dominio catalitico di molte famiglie di chinasi tra cui le MAPK e le DYRK possiede un caratteristico sito regolatorio localizzato tra i subdomini VII e VIII, denominato *loop* di attivazione, la cui fosforilazione è necessaria per l'attivazione. Il numero di residui che compongono il *loop* di attivazione è altamente variabile tra i membri della superfamiglia delle proteine chinasi e va dagli 8 ai 37 amminoacidi. Anche la similarità è piuttosto scarsa e le strutture cristallografiche di numerose chinasi indicano che non è conservata neanche la conformazione (Wilson et al., 1996).

Il *loop* di attivazione è stato particolarmente studiato nella p38MAPK, dove il sito regolativo è costituito dalla sequenza treonina-glicina-tirosina (TGY). È stato dimostrato che la fosforilazione dei residui di treonina 180 (T180) e tirosina 182 (Y182) è necessaria per l'attività enzimatica (Han et al., 1994) e che T180 è bersaglio di auto-fosforilazione (Diskin et al., 2007). Dalla struttura cristallografica della forma inattiva di p38 MAPK si nota che il *loop* di attivazione non fosforilato occupa il sito di interazione del substrato interferendo probabilmente con il suo legame. Si ritiene che la fosforilazione sulla tirosina induca un movimento del *loop* tale da permettere al fosfato carico negativamente di occupare la "tasca" formata dalle due arginine conservate presenti nel subdominio VIII. Questa interazione consentirebbe un cambiamento conformazionale finalizzato a sbloccare il sito attivo (Wang et al., 1997). È importante notare che anche in HIPK2 troviamo due arginine, conservate all'interno della famiglia delle DYRK, in posizione 358 e 361.

HIPK2 e le altre chinasi della famiglia DYRK, essendo lontanamente correlate alle MAPK, conservano solamente la tirosina carbossi-terminale della tripletta regolativa (Hofmann et al., 2000). In particolare DYRK1A umana contiene la sequenza Tirosina-Glutamina-Tirosina (YQY) mentre HIPK2 Serina-Treonina-Tirosina (STY). La rilevanza funzionale di tale sito è evidente in DYRK1A dove la sostituzione delle due tirosine con fenilalanina (DYRK- Y319/321) sopprime l'auto-fosforilazione sulle tirosine come anche l'attività chinasi (Kentrup et al., 1995). Ci sono

evidenze che anche in HIPK2 la tripletta del *loop* di attivazione possa avere un ruolo importante nella regolazione dell'attività della proteina, infatti, la sua sostituzione con gli amminoacidi non fosforilabili alanina-alanina-fenilalanina (AAF), insieme alla sostituzione K221R, porta ad un mutante dominante negativo con una perdita della sua funzione di repressore trascrizionale (Harada et al., 2003).

Recentemente è stato proposto che nelle DYRK l'auto-fosforilazione sulla Y del *loop* di attivazione sia mediata da un intermedio conformazionale della chinasi ancora legata al ribosoma (fig 6). Terminata la traduzione, la proteina fosforilata in Y acquisirebbe il suo ripiegamento tridimensionale maturo e perderebbe la sua attività tirosina-chinasica conservando esclusivamente la capacità di fosforilare S e T. La differente sensibilità a piccoli inibitori molecolari della proteina ancora legata al ribosoma rispetto a quella completa suggerisce fortemente che le due proteine abbiano una conformazione tridimensionale diversa (Lochhead et al., 2005).

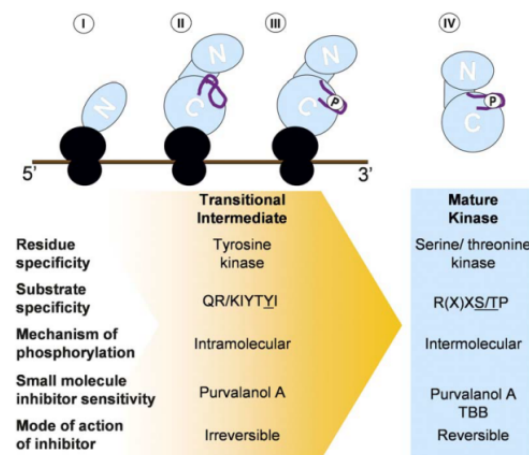


Figura 6. Meccanismo di attivazione delle DYRK. Schematizzazione del meccanismo di auto-fosforilazione in tirosina di DYRK1A e riassunto delle principali caratteristiche di ciascun intermedio (Lochhead et al., 2005).

1.3 Ruolo di HIPK2 nella proliferazione e nella risposta al danno al DNA: due facce di un oncosoppressore.

I topi knockout *Hipk2*^{-/-} non nascono secondo i normali rapporti mendeliani e circa il 40% dei neonati muore nei primi tre giorni dopo la nascita. Sebbene siano vitali e fertili (Isono et al., 2006) i topi *Hipk2*^{-/-} che sopravvivono sono notevolmente più piccoli dei loro fratelli con il gene selvatico (Trapasso et al., 2009) ed hanno difetti di proliferazione nei neuroni sensoriali (Wiggins et al., 2004), nei precursori eritroidi (Hattangadi et al., 2010) e nei fibroblasti embrionali (Trapasso et al., 2009).

Nelle cellule in coltura si può osservare una forte e persistente riduzione dei livelli di HIPK2 durante l'uscita dal ciclo cellulare associata al differenziamento ematopoietico o del muscolo scheletrico. Analogamente, l'espressione di HIPK2 viene soppressa in seguito a diversi tipi di uscita dal ciclo cellulare come la deprivazione di fattori di crescita o nei linfociti del sangue periferico quiescenti. In entrambi i casi, l'aggiunta di fattori di crescita o la stimolazione con fitoemoagglutinina, induce l'ingresso nel ciclo cellulare e la ri-espressione di HIPK2 (Iacovelli et al., 2009).

Recentemente è stato individuato un nuovo ruolo di HIPK2 nella citodieresi, lo stadio finale della citochinesi (Rinaldo et al., 2012). Durante le fasi finali della divisione cellulare HIPK2 si localizza al midbody, il ponte citoplasmatico che si forma tra le due cellule figlie, e lì fosforila sulla serina 14 un istone H2B extra-cromosomale. L'attività di HIPK2 al midbody è necessaria per una corretta divisione cellulare e per prevenire la tetra- e poli-ploidizzazione delle cellule.

D'altra parte, è stato dimostrato che HIPK2 è un potente attivatore dell'apoptosi. Durante la risposta al danno al DNA HIPK2 modula l'attività di molte proteine correlate direttamente o indirettamente all'apoptosi. In particolare, in risposta a dosi letali di agenti genotossici HIPK2 sente l'intensità del danno ed innesca la via apoptotica. Uno dei bersagli meglio caratterizzati è l'oncosoppressore p53. p53 è uno dei principali regolatori della risposta cellulare al danno al DNA la cui corretta attività contribuisce alla salvaguardia dell'integrità genomica. In particolare, p53 è in grado di prevenire la trasformazione neoplastica innescando meccanismi di difesa quali l'arresto proliferativo, se il danno è riparabile, oppure apoptosi o senescenza replicativa, se il danno è irreparabile. L'importanza del suo ruolo è evidente considerando l'elevato numero e tipo di tumori umani in cui il gene *TP53* è mutato o la proteina p53 non funzionante a causa di alterazioni dei meccanismi molecolari di regolazione che ne controllano l'attività. In entrambi i casi, l'impossibilità di attivare i meccanismi apoptotici innescati da p53 non solo favorisce la progressione tumorale, ma rende le cellule resistenti ai trattamenti radio- e chemio-terapici (Lavin and Gueven, 2006). In assenza di stimoli genotossici, p53 è una proteina con emivita molto breve, la cui espressione è regolata in modo tale da essere espressa a livelli molto bassi, a volte non rilevabili. Il principale responsabile di questa regolazione negativa è MDM2, una E3 ubiquitina ligasi che induce la degradazione di p53 attraverso il proteosoma. Inoltre, MDM2, interagendo fisicamente con p53, ne impedisce il legame con il DNA e ne promuove il trasporto nel citoplasma. In seguito a stress genotossico p53 viene stabilizzata grazie a modificazioni post-traduzionali quali fosforilazioni ed acetilazioni a carico di specifici residui carbossi- ed amino-terminali. Queste modificazioni le consentono di sfuggire al controllo di MDM2 e di accumularsi nel nucleo divenendo attiva (Vousden, 2000). Questi eventi sono indipendenti dall'intensità del danno in

quanto si verificano sia in seguito a trattamenti citostatici che letali. In quest'ultimo caso, HIPK2 gioca un ruolo fondamentale nell'induzione dell'attività apoptotica di p53. Infatti, in risposta a stress genotossici letali, come trattamento con alte dosi di UV, HIPK2, che co-localizza con p53 e PML nei *nuclear bodies* (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002), viene stabilizzata e fosforila p53 in corrispondenza del residuo Serina 46 (S46) (D'Orazi et al., 2002), evento questo considerato un "punto di non ritorno" nell'attivazione del *pathway* apoptotico dipendente da p53. Infatti, in seguito a danno genotossico grave, la fosforilazione di p53 in S46 è un evento tardivo che promuove un cambiamento nell'affinità per i promotori con la conseguente attivazione della trascrizione dei geni coinvolti nei processi apoptotici, come *BAX*, *PIG*, e *PTEN*, piuttosto che di quelli responsabili dell'arresto proliferativo, come *p21Waf1* (Oda et al., 2000; Mayo et al., 2005). 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. Analogamente, in cellule prive di p53, in seguito a trattamenti con chemioterapici HIPK2 fosforila $\Delta Np63\alpha$, un'isoforma di p63 che favorisce la sopravvivenza delle cellule e ne determina la degradazione via proteosoma (Lazzari et al., 2011). 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).

1.4 HIPK2 nei tumori

È stato dimostrato che una riduzione dei livelli di HIPK2 tramite interferenza specifica dell'RNA ostacola la via apoptotica ed induce resistenza a differenti trattamenti anti-tumorali, suggerendo che anche HIPK2, come altri fattori coinvolti nella risposta allo stress o attivatori dell'apoptosi, sia esso stesso un oncosoppressore (Puca et al., 2010). Inoltre è stato visto che topi con genotipo eterozigote *Hipk2*^{+/-} hanno una maggiore tendenza allo sviluppo di tumori cutanei indotti e promossi da carcinogeni chimici e allo sviluppo di linfomi timici in seguito ad irraggiamento con raggi gamma (Wei et al., 2007; Mao et al., 2012). Questi dati suggeriscono che HIPK2 sia un oncosoppressore aplo-insufficiente.

Al contrario di molti oncosoppressori, le mutazioni nella regione codificante di HIPK2 sono rare, tuttavia l'espressione di HIPK2 spesso risulta essere deregolata. Infatti, nei tumori umani sono stati osservati fenotipi diversi, apparentemente divergenti. Per esempio, in alcuni tumori è stata trovata una delocalizzazione forzata di HIPK2 nel citoplasma con conseguente inattivazione delle sue funzioni nucleari. In particolare, è stato descritto che in molti tumori della mammella, l'iperespressione dell'oncogene HMGA1 (High Mobility Group 1) promuove la localizzazione 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 un altro studio Wee e i suoi collaboratori hanno mostrato che una proteina di fusione, potenzialmente leucogenica, formata da PEBP2b (chiamata anche CBFb) e SMMHC, promuove la localizzazione di HIPK2 nel citoplasma, in corrispondenza di strutture filamentose, impedendo in questo modo la fosforilazione di p300 nel nucleo (Wee et al., 2008).

Una diminuzione dei livelli di espressione di HIPK2 e una perdita di eterozigosità sono stati osservati in alcuni tumori della tiroide (Lavra et al., 2011) ed della mammella (Pierantoni et al., 2002). In contrasto con quanto descritto fino ad ora, è stato riportato 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). Al momento non sono note le basi molecolari di questo differente comportamento.

Fenotipi contrastanti sono stati osservati anche in un'altra patologia proliferativa: la fibrosi. In particolare, è stato visto che la fibrosi polmonare idiopatica, una malattia caratterizzata dall'aberrante proliferazione dei fibroblasti polmonari e dall'eccessiva deposizione di matrice extracellulare, è caratterizzata da perdita di eterozigotà al livello del locus del gene *HIPK2* e da una riduzione dei suoi livelli di mRNA e di proteina (Ricci et al., 2012). Al contrario, in un modello di fibrosi renale, alti livelli di *HIPK2* sono associati allo sviluppo della malattia mentre l'assenza di *HIPK2* è considerata un fattore protettivo (Jin et al., 2012)

2. AGGREGATI PROTEICI E AGGRESOMI

Le proteine vengono sintetizzate sui ribosomi come catene lineari di amminoacidi ma, per poter essere funzionali, generalmente devono essere in grado di formare una struttura tridimensionale stabile. Infatti, alle temperature fisiologiche e in soluzione acquosa, le catene polipeptidiche delle proteine si ripiegano in una forma che nella maggior parte dei casi è globulare. Questo processo, chiamato *folding* proteico, è guidato dalla sequenza amminoacidica della proteina stessa. La catena polipeptidica lineare si ripiega in modo tale da esporre sulla superficie le catene laterali idrofiliche, rendendole disponibili per formare legami idrogeno e sequestrando all'interno quelle idrofobiche, schermandole dal solvente. Il ripiegamento tridimensionale di una proteina avviene in concomitanza con la traduzione (co-traduzionalmente) e la porzione N-terminale comincia a strutturarsi mentre la porzione C-terminale deve ancora essere sintetizzata. Esiste una classe di proteine, chiamati chaperoni molecolari, che possono assistere il processo di *folding* legando le porzioni idrofobiche della catena polipeptidica che si sta ripiegando. In questo modo gli chaperoni impediscono che sequenze amminoacidiche a carattere prevalentemente idrofobico, poste in vicinanza tra loro, si aggregino per minimizzare i contatti con l'ambiente acquoso polare. L'importanza degli chaperoni molecolari è sottolineata dal fatto che, lungo il percorso che porta alla struttura nativa, spesso esistono uno o più stati intermedi transitori e parzialmente ripiegati che possono esporre amminoacidi idrofobici sulla superficie prima di sequestrarli nel *core* della proteina globulare. Se queste porzioni non fossero protette dagli chaperoni aumenterebbe notevolmente il rischio di formare aggregazioni di proteine soprattutto durante la traduzione quando molte catene polipeptidiche nascenti, identiche tra loro, sono sintetizzate sui polisomi.

Non sempre le proteine riescono a raggiungere la loro struttura nativa. Vari fattori esterni come pH, temperatura, forza ionica ed alcune particolari mutazioni possono destabilizzare lo stato nativo o diminuire l'efficienza del *folding* favorendo quindi l'aggregazione. L'incapacità di raggiungere la conformazione proteica nativa può avere effetti dannosi com'è evidente in molte malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e il morbo di Huntington, caratterizzate dall'accumulo di proteine non correttamente ripiegate, rispettivamente β -amiloide e tau, α -sinucleina e Huntingtina (Brundin et al., 2010). Le cellule eucariotiche (ed anche alcune procariotiche) hanno evoluto alcuni meccanismi di controllo di qualità volti a contrastare la formazione di aggregati proteici o favorire la loro eliminazione. Qualora si formasse una proteina non correttamente ripiegata e di conseguenza prona all'aggregazione, un primo meccanismo cellulare che interviene è il sistema ubiquitina-proteasoma che indirizza la proteina potenzialmente dannosa alla degradazione proteolitica. Quando le proteine che non hanno raggiunto il *folding* nativo sfuggono alla degradazione via proteasoma si possono formare delle aggregazioni proteiche.

A questo punto interviene un secondo meccanismo cellulare deputato alla rimozione degli aggregati: la formazione di aggresomi e la loro successiva eliminazione tramite autofagia (Garcia-Mata et al., 2002, Kopito, 2000). Gli aggresomi sono aggregati di proteine non strutturate correttamente che possiedono delle caratteristiche peculiari:

- sono localizzati in prossimità del centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC)
- sono insolubili
- inducono modificazioni citoscheletriche
- reclutano fattori che ne aiutano la rimozione
- innescano l'autofagia

Gli aggresomi possono essere considerati come un aggregato di aggregati. Essi si formano in prossimità del MTOC, in posizione perinucleare, in seguito al trasporto di aggregati di dimensioni minori lungo i microtubuli. Questo trasporto è un processo attivo che dipende dal motore proteico dineina che si muove in modo ATP-dipendente verso l'estremità negativa dei microtubuli. Nonostante sembri esistere un unico percorso che conduce alla formazione di aggresomi, la loro struttura globulare è piuttosto variabile e dipende sia dal substrato che dal tipo cellulare coinvolto. Alcuni aggresomi hanno una forma sferica del diametro di 1-3 μ m, altri una forma più estesa definita “a nastro” (Fig. 7). Le due diverse forme mostrano le stesse caratteristiche biochimiche, infatti entrambe risultano essere ugualmente insolubili in detergenti (Garcia-Mata et al., 2002). Al momento non sono noti i meccanismi molecolari che definiscono la forma finale di un aggresoma.

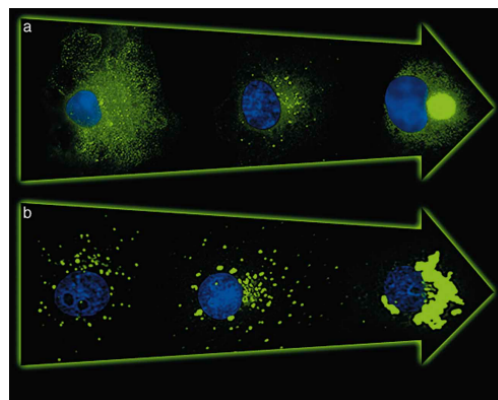


Figura 7. Dinamica della formazione di aggresomi. (A) Nelle cellule che iperesprimono GFP-250 generalmente si formano piccoli aggregati sparsi in tutta la cellula e successivamente vengono trasportati al MTOC. Gli aggregati sparsi hanno dimensioni uniformi e generalmente non si fondono tra loro. (B) Nelle cellule che iperesprimono GFP-GCP170 si formano aggregati periferici che generalmente si fondono l'uno con l'altro a formare aggregati di dimensioni maggiori. Anche questi aggregati sono poi trasportati all'MTOC dove formano un aggresoma con una morfologia detta a “nastro” (da Garcia-Mata et al., 2002)

La formazione degli aggresomi induce un profondo rimodellamento del citoscheletro, in particolare della vimentina, componente dei filamenti intermedi. Nelle cellule in interfase i filamenti di

vimentina formano una rete distribuita in tutto il citoplasma mentre nelle cellule che presentano aggresomi si ridistribuiscono a formare una sorta di “gabbia” intorno all’aggregato (Garcia-Mata et al., 2002; Kopito, 2000). Gli aggresomi non sono statici depositi di proteine-spazzatura, ma reclutano molti componenti cellulari al fine di coadiuvare l’eliminazione dell’aggregato. È noto che alcuni chaperoni molecolari come per esempio i membri della famiglia HSP70, così come i componenti del proteasoma, sono invariabilmente associati con gli aggresomi. Spesso i substrati aggregati sono ubiquitilati, tuttavia tale processo non sembra essere necessario alla formazione dell’aggresoma, ma piuttosto sembra essere una risposta cellulare a proteine specifiche (Garcia-Mata et al., 2002).

Nonostante il reclutamento di chaperoni e di componenti del macchinario degradativo, la rimozione di proteine aggregate dall’aggresoma è inefficiente. La presenza prolungata di aggresomi sembra innescare un meccanismo alternativo di degradazione chiamato autofagia, utilizzato dalla cellula anche per la degradazione di grandi strutture come mitocondri e perossisomi. I componenti destinati alla degradazione, con un meccanismo ancora scarsamente compreso, sono prima inglobati in un autofagosoma che successivamente si fonde con i lisosomi consentendo la degradazione degli aggregati da parte delle idrolasi lisosomiali (Garcia-Mata et al., 2002; Kopito, 2000).

3. SPLICING ALTERNATIVO

I geni degli eucarioti sono caratterizzati da brevi sequenze codificanti, gli esoni, alternate a lunghe regioni non codificanti, gli introni. Per una corretta traduzione, gli introni devono essere rimossi e gli esoni uniti insieme a formare il messaggero maturo. Questo processo che coinvolge sequenze *in cis* e numerosi fattori *in trans* prende il nome di *splicing*. (Matlin et al., 2005). Chimicamente, consiste di due reazioni di trans-esterificazione, ciascuna costituita da un attacco nucleofilo al legame fosfodiesterico terminale dell'introne. Queste reazioni sono mediate da un grande complesso macromolecolare chiamato spliceosoma, costituito da cinque ribonucleoproteine (small nuclear ribonucleoprotein, snRNPs) e numerose proteine ausiliarie, che si assembla sul pre-mRNA guidato da sequenze consenso localizzate alle estremità degli introni. Lo *splicing* è un processo altamente regolato: stime recenti indicano che circa il 95% dei geni umani multi-esonici vada incontro a *splicing* alternativo. In questo modo vengono unite tra loro diverse combinazioni di siti accettori e donatori di *splicing* e vengono prodotte molteplici isoforme a partire dallo stesso gene. Lo *splicing* alternativo consente ad un unico gene di generare molteplici isoforme di RNA messaggero maturo che saranno poi tradotte in proteine funzionalmente differenti (Chen et al., 2009).

In particolare esistono vari tipi di *splicing* alternativo:

- esoni a cassetta: alcuni esoni possono essere indipendentemente inclusi o esclusi dall'mRNA
- esoni mutualmente esclusivi: è selezionato solo un esone tra due o più varianti
- siti di *splicing* alternativi al 3' o al 5'
- mantenimento di un introne
- uso di promotori o terminatori multipli

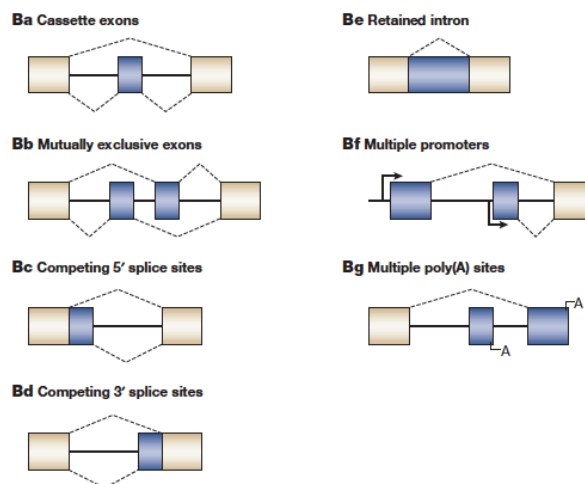


Figura 8: Schematizzazione dei diversi meccanismi di *splicing* alternativo. (Matlin et al., 2005).

La scelta tra quale esone debba essere rimosso e quale incluso dipende da sequenze di RNA e regolatori proteici. In base alla posizione ed alla funzione, gli elementi regolatori in cis sono divisi in quattro categorie: *enhancers* di *splicing* esonici (ESEs), *silencers* di *splicing* esonici (ESSs), *enhancers* di *splicing* intronici (ISEs) e *silencers* di *splicing* intronici (ISSs). Generalmente gli ESEs sono legati da membri della famiglia delle proteine SR mentre ISSs ed ESSs sono legati da hnRNPs (heterogeneous ribonucleoproteins) (Chen et al., 2009).

Le proteine SR sono caratterizzate da uno o più domini di riconoscimento dell'RNA e da domini ricchi in arginine e serine, responsabili delle interazioni proteina-proteina. Queste proteine agiscono facilitando il reclutamento dello spliceosoma ed hanno un ruolo molto importante nel favorire il riconoscimento del sito di *splicing*. Le proteine hnRNP sono una classe eterogenea di fattori contenenti diversi tipi di motivi di legame all'RNA e domini accessori coinvolti nelle interazioni proteiche. In generale, le hnRNP agiscono impedendo il legame di uno o più fattori di *splicing* (Manley et al., 2005).

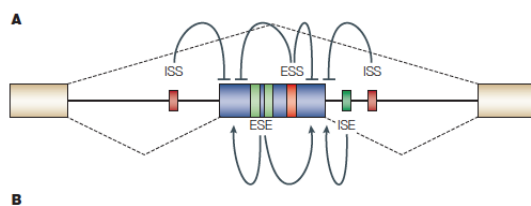


Figura 9. Schematizzazione delle sequenze regolative dello *splicing* alternativo (Manley et al., 2005)

Molti eventi di *splicing* alternativo sono caratterizzati da una complessa interazione tra regolatori positivi e negativi che agiscono rispettivamente attraverso *enhancers* e *silencers*. Attivatori ed inibitori hanno effetti combinatori o competitivi sullo *splicing* del pre-mRNA e alla fine, la scelta di includere o meno un esone sarà determinata dall'attività o dalla concentrazione di ciascun regolatore, tipicamente proteine SR o hnRNP (Manley et al., 2005).

Numerosi oncogeni e oncosoppressori sono regolati tramite *splicing* alternativo. Spesso le diverse isoforme hanno funzioni opposte nel promuovere o contrastare l'insorgenza di tumori. Un esempio interessante riguarda il regolatore dell'apoptosi BCL-X. Il pre-mRNA di Bcl-X ha due siti di *splicing* alternativi al 5' dell'introne numero 2 (Kaida et al., 2012).

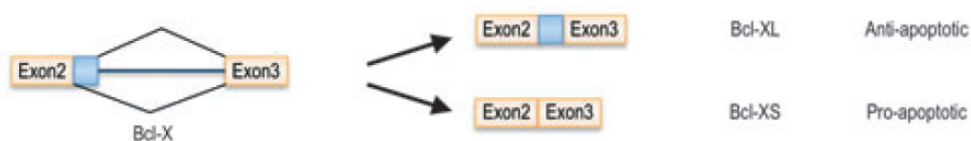


Figura 10. Rappresentazione schematica dello *splicing* alternativo di Bcl-X e breve descrizione delle due diverse isoforme (Kaida et al., 2012).

Se viene utilizzato il sito a monte viene prodotta la forma pro-apoptotica Bcl-X_S, al contrario l'uso del sito a valle risulta nella proteina Bcl-X_L con attività anti-apoptotica. In accordo con quanto detto, Bcl-X_L è iperespressa in numerosi tipi di cellule tumorali mentre Bcl-X_S è generalmente repressa. Il pattern di *splicing* di Bcl-X è controllato da numerosi regolatori come le proteine che legano l'RNA RBM25 e hnRNP-H o il regolatore di *splicing* Sam68 che lega l'mRNA di Bcl-X e, promuovendo lo *splicing* a livello del sito a monte, induce l'aumento della isoforma Bcl-X_S. L'inattivazione di Sam68 causa trasformazione neoplastica mentre la sua iperespressione induce arresto del ciclo cellulare e apoptosi, suggerendo che Sam68 stesso agisca da oncosoppressore (Kaida et al., 2012). Sono state anche descritte delle isoforme di *splicing* specifiche delle cellule tumorali. Per esempio, il recettore tirosin-chinasico RON, coinvolto nella mobilità cellulare e nell'invasione, ha un'isoforma alternativa, mancante dell'esone 11 (DRON) (Pal et al., 2012).

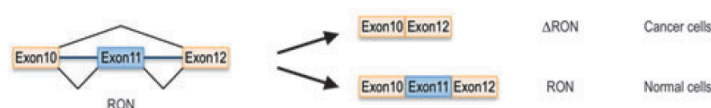


Figura 11. Rappresentazione schematica dello *splicing* alternativo di RON e breve descrizione delle due diverse isoforme (Kaida et al., 2012).

L'isoforma DRON è costitutivamente attiva anche in assenza di ligando ed è stata trovata altamente espressa in numerosi tumori. Il pattern di *splicing* di RON è regolato dal fattore SRSF1 che lega direttamente un ESE e stimola l'esclusione dell'esone 11. È importante notare che i livelli di SRSF1 sono alti in vari tumori umani e che la sua iperespressione trasforma cellule immortalizzate, suggerendo che SRSF1 abbia attività oncogenica (Pal et al., 2012).

RISULTATI

HIPK2 è una proteina estensivamente fosforilata.

È noto che la chinasi HIPK2 è in grado di auto-fosforilarsi (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002 e figura 12 A). Per mappare i siti di fosforilazione di HIPK2 sono stati condotti esperimenti di spettrometria di massa. In particolare sono state analizzate le proteine di fusione *full-length* GST-HIPK2 nativa, espressa in un sistema procariotico (GST-HIPK2) o eucariotico (eGST-HIPK2) e il corrispettivo mutante inattivo dal punto di vista chinamico GST-HIPK2, espresso in eucarioti (eGST-K221R). Le tre proteine ricombinanti sono state purificate mediante GST pull-down e separate mediante SDS-PAGE. Le bande appropriate sono state tagliate e sottoposte a digestione con tripsina e chimotripsina e i peptidi ottenuti sono stati analizzati mediante liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) per identificare i peptidi fosforilati.

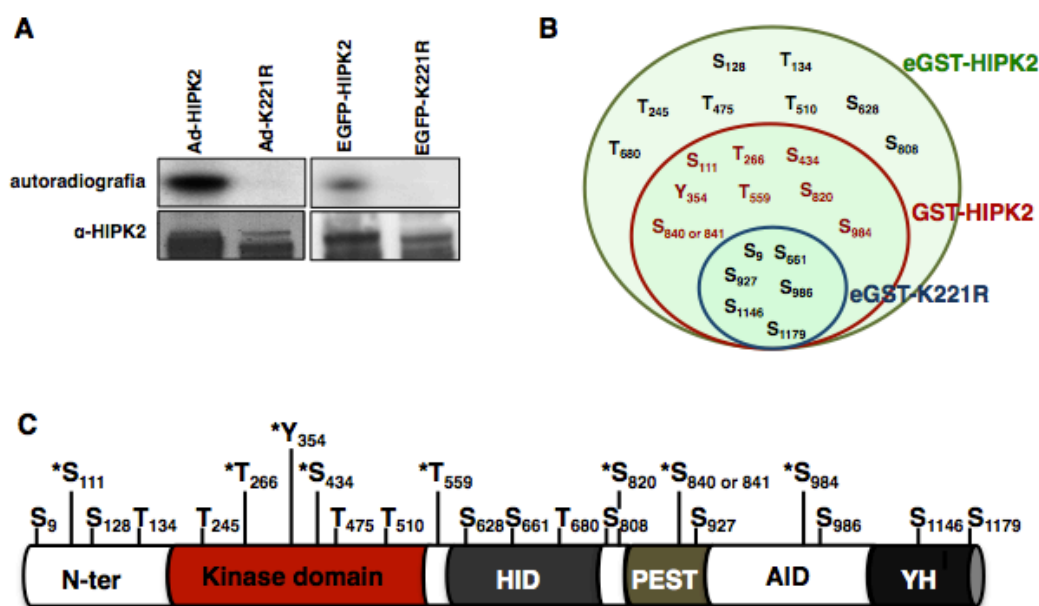


Figura 12. HIPK2 è fosforilata ed auto-fosforilata. **A)** Fibroblasti embrionali murini sono stati infettati con un adenovirus ricombinante che veicola HIPK2 nativa (AdHIPK2) o il mutante K221R (AdK221R) oppure sono stati trasfettati transientemente con vettori di espressione che codificano per la proteina EGFP-HIPK2 o EGFP-K221R. Le proteine sono state immunoprecipitate e analizzate mediante Western blot (pannelli inferiori) o incubate con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, separate mediante SDS-PAGE e analizzate mediante autoradiografia (pannelli superiori). **B)** Distribuzione dei siti di fosforilazione identificati mediante spettrometria di massa nelle proteine indicate. **C)** Rappresentazione schematica dei domini strutturali di HIPK2 con i 22 residui fosforilati identificati. I siti indicati con gli asterischi rappresentano i siti di auto-fosforilazione.

In questo modo nella eGST-HIPK2 prodotta in cellule umane abbiamo individuato 21 fosfo-peptidi, corrispondenti a 22 fosfo-residui (Figura 12 B e C e Tabella 1). Dato che 14 di questi residui fosforilati erano presenti anche nella proteina prodotta in batteri è possibile che i restanti 8 residui possano essere siti fosforilati da altre chinasi eucariotiche o siti di auto-fosforilazione che necessitano di precedenti diverse modificazioni post-traduzionali (Figura 12 B). Il mutante GST-K221R perde 8 dei 14 residui trovati fosforilati sia nelle cellule batteriche che umane. Questi otto residui trovati fosforilati nel mutante inattivo dal punto di vista chinamico rappresentano putativi siti di auto-fosforilazione (Figura 12 B). È possibile che i restanti sei siti possano essere il prodotto della fosforilazione da parte di altre chinasi o siano dovuti ad una parziale attività residua del mutante.

La fosforilazione del residuo Y354 influenza la funzione di HIPK2.

Dai dati di spettrometria di massa emerge che i siti di fosforilazione e di putativa auto-fosforilazione di HIPK2 sono distribuiti in tutti i suoi domini, suggerendo un sistema di regolazione complesso (Figura 12 C). Abbiamo quindi deciso di concentrare la nostra attenzione sui putativi siti di auto-fosforilazione presenti nel dominio chinamico. In particolare vi è un sito SP canonico al livello del residuo 434, un sito TC non canonico al livello del residuo 266 e la Y in posizione 354 appartenente al presunto *loop* di attivazione. Per prima cosa abbiamo voluto confermare questi siti analizzando mediante MS/MS la proteina ricombinante His-HIPK2 (158-557), mancante delle estremità N- e C- terminali e contenente il dominio chinamico ed espressa in cellule di insetto. In queste condizioni sono stati trovati fosforilati solo i residui S434 e Y354 (Tabella 1). Poichè la T266 non costituiva un sito canonico di fosforilazione da parte di HIPK2, abbiamo deciso di escluderlo da analisi ulteriori. A questo punto i residui S434 e Y354 sono stati mutagenizzati e sostituiti con aminoacidi non fosforilabili, rispettivamente alanina e fenilalanina. I mutanti S434A e Y354F sono stati trasfettati transientemente in cellule di osteosarcoma umano U2OS e la loro capacità di indurre morte cellulare è stata valutata mediante conte con Trypan Blue. I risultati (Figura 13) indicano che il mutante S434A ha la stessa abilità di indurre morte della proteina nativa mentre il mutante Y354F ed il doppio mutante Y354F/S434 hanno un'attività ridotta. Ciò suggerisce che la fosforilazione della Y354 è necessaria per una piena attività funzionale della proteina.

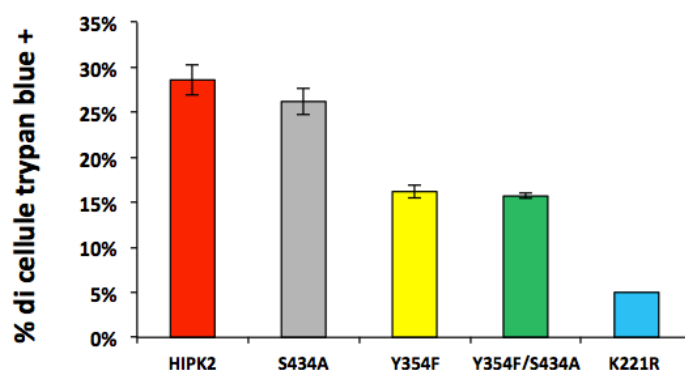


Figura 13. La fosforilazione della Y354 influenza la funzione di HIPK2. Cellule di osteosarcoma umano U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione codificanti le proteine indicate. Dopo 24 ore dalla trasfezione la mortalità cellulare è stata valutata contando le cellule positive al colorante Trypan blue.

La fosforilazione della tirosina 354 è un evento autocatalitico.

Per confermare che HIPK2 è in grado di auto-fosforilarsi in tirosina sono stati condotti esperimenti di Western blot usando due anticorpi α -fosfotirosina. I risultati mostrano che entrambi gli anticorpi reagiscono solo con la proteina HIPK2 nativa ma non con il mutante K221R (Figura 14 A). Successivamente abbiamo voluto verificare se HIPK2 defosforilata in vitro fosse in grado di rifosforilarsi in seguito ad aggiunta di ATP. Poiché non siamo stati in grado di defosforilare efficientemente la HIPK2 *full-length* abbiamo deciso di utilizzare la forma tronca His-HIPK2(158-557). Quest'ultima proteina è stata quindi sottoposta a defosfoliazione in vitro e successivamente a saggio chinamico freddo. I campioni di His-HIPK2(158-557) non trattata, defosforilata, o defosforilata e poi rifosforilata sono stati analizzati mediante Western blot con anticorpi α -fosfotirosina. I risultati indicano che il trattamento con la fosfatasi è in grado di defosforilare la proteina tronca e che questa è in grado di rifosforilarsi in tirosina in seguito a defosforilazione (Figura 14 B).

Per identificare i residui di tirosina rifosforilati in seguito a defosforilazione sono stati condotti esperimenti analoghi e i tre campioni (non trattato, defosforilato e defosforilato e poi rifosforilato) sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati con LC-MS/MS. In accordo con l'analisi di Western blot il picco relativo al peptide ACVSTYLQSR fosforilato singolarmente (m/z : 1264.5 vs 1184.5 del non fosforilato) è presente nel His-HIPK2(158-557) non trattato e nel campione rifosforilato (Figura 14 D e F) mentre scompare in seguito a defosforilazione (Figura 14 E). Analisi di MS/MS hanno confermato che il residuo fosforilato in entrambi i campioni è la Y354 (Figura 14 G e H). Questi risultati indicano che la fosforilazione della Y354 è un evento autocatalitico.

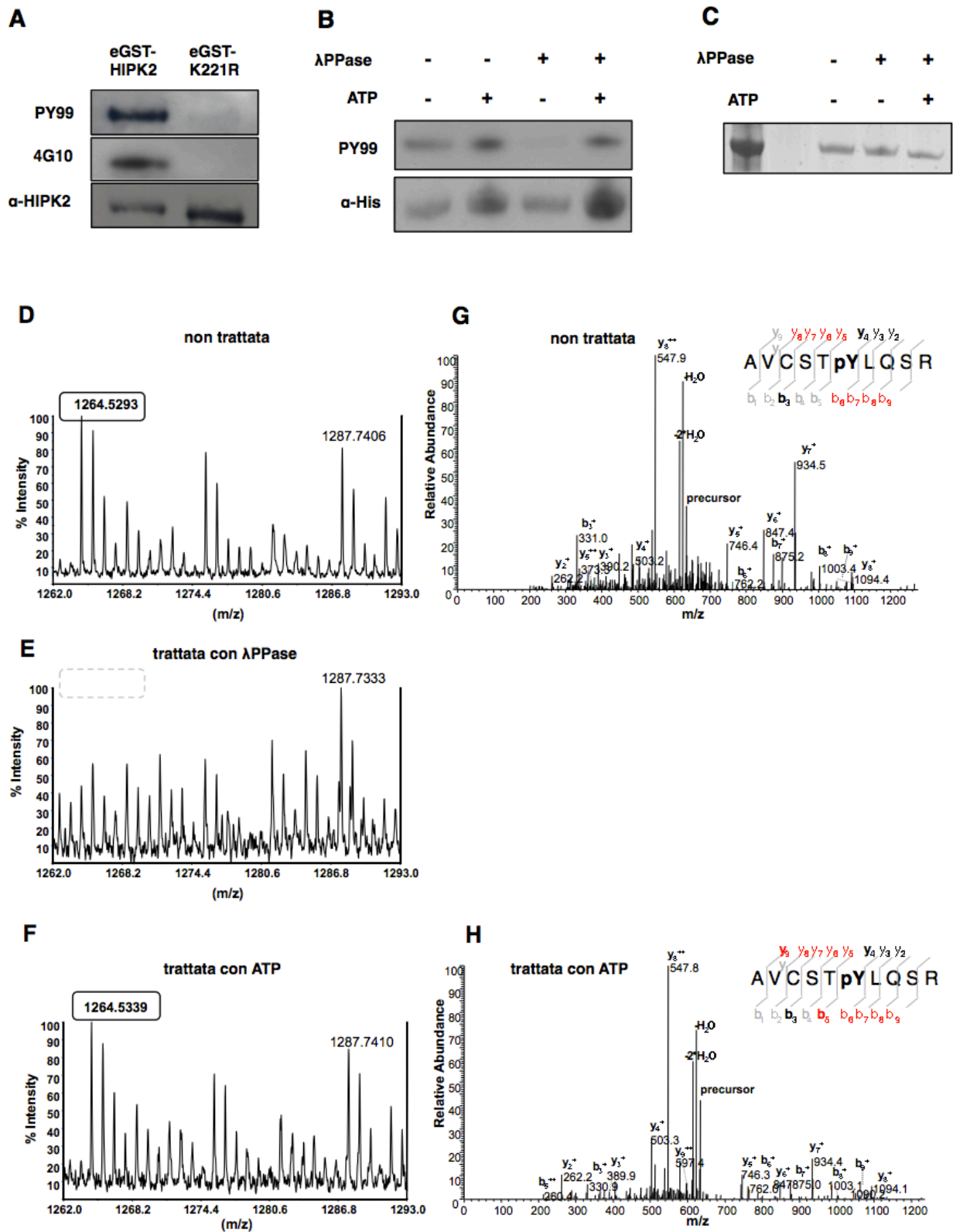


Figura 14. La fosforilazione della Y354 è un evento autocatalitico. **A)** Le proteine ricombinanti eGST-HIPK2 e eGST-K221R sono state prodotte in cellule umane H1299, purificate mediante GST-pull down e analizzate mediante Western blot con due diversi anticorpi α -pTyr, PY99 e 4G10. La normalizzazione è stata effettuata con un anticorpo α -HIPK2. **B)** La proteina ricombinante His-HIPK2(158-557) è stata sottoposta a Western blot con l'anticorpo α -pTyr, PY99 in seguito ai trattamenti indicati. La normalizzazione è stata effettuata con un anticorpo α -His. **C)** Tre campioni uguali di His-HIPK2(158-557) sono stati trattati come in **(B)**, separati mediante SDS-PAGE e colorati con Coomassie

colloidale. Le bande sono state tagliate dal gel ed analizzate mediante MALDI-MS (**D, E, F**) and LC-MS/MS (**G, H**). Sono riportati gli spettri MALDI-MS relativi allo ione corrispondente al fosfo-peptide AVCSTpYLQSR (picco a m/z 1264.5) della proteina non trattata (**D**), trattata con fosfatasi (**E**) e trattata con fosfatasi e successivamente sottoposta a saggio chinasi (**F**). **G e H**) Identificazione mediante LC-MS/MS dei siti di fosforilazione relativi ai campioni riportati rispettivamente in (**D**) e (**F**).

L'auto-fosforilazione della Y354 è necessaria per l'attività serina/tronina chinasi di HIPK2.

Nella famiglia delle DYRK la fosforilazione della tirosina del *loop* di attivazione avviene in *cis* sulla proteina nascente ancora legata al ribosoma. Inoltre, è stato proposto che dopo il rilascio dal ribosoma la chinasi matura perda la sua capacità di fosforilare tirosine e diventi una serina/treonina chinasi (Lochhead et al., 2005). Ci siamo quindi chiesti se la Y354 si comportasse come la tirosina del *loop* di attivazione delle DYRK e se la sua fosforilazione fosse necessaria per l'attività catalitica di HIPK2 su se stessa e sui suoi substrati. Per prima cosa abbiamo valutato la sensibilità di HIPK2 a due inibitori delle DYRK con diversa specificità. In particolare il purvalanol A ma non il TBB è in grado di inibire l'auto-fosforilazione della tirosina del *loop* di attivazione durante la traduzione mentre entrambi inibiscono la fosforilazione in *trans* dei substrati (Lochhead et al., 2005). Per valutare l'attività di auto-fosforilazione in tirosina, HIPK2 è stata tradotta in vitro in presenza o assenza degli inibitori e analizzata mediante Western blot usando un anticorpo α -fosfotirosina. I risultati mostrano che il Purvalanol A, ma non il TBB, inibisce la capacità di HIPK2 di auto-fosforilarsi in tirosina durante la traduzione (Figura 15 A). Per valutare l'attività di fosforilazione in *trans* sono stati effettuati dei saggi chinasi caldi in presenza o assenza degli inibitori. I risultati mostrano che entrambi gli inibitori inibiscono la fosforilazione della proteina basica della mielina (MBP) da parte di HIPK2 (Figura 15 B).

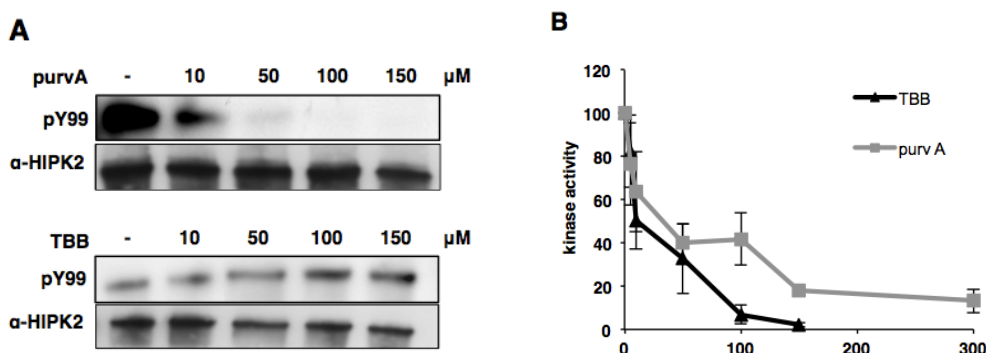
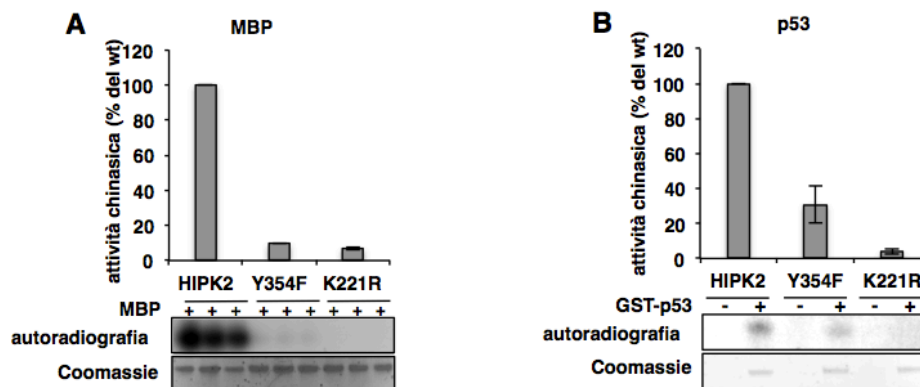


Figura 15. Effetti del Purvalanol A e del TBB sull'attività chinasi di HIPK2. **A)** GST-HIPK2 è stata tradotta *in vitro* con un lisato di reticolociti di coniglio in presenza di Purvalanol A (pannelli superiori) o TBB (pannelli inferiori) alle concentrazioni indicate. Le proteine tradotte *in vitro* sono state purificate con GST pull-down, separate mediante SDS-PAGE e immunodecorate con gli anticorpi α -pTyr PY99 o α -HIPK2. **B)** La eGST-HIPK2 prodotta in cellule di mammifero è stata sottoposta a saggio chinasi *in vitro* sul substrato MBP in presenza di concentrazioni crescenti di

TBB e Purvalanol A. La fosforilazione della MBP è stata misurata valutando l'incorporazione di ^{32}P in seguito a SDS-PAGE ed autoradiografia. I dati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Per continuare la nostra analisi sul ruolo della Y354 abbiamo sostituito la tirosina con l'aminoacido non fosforilabile fenilalanina. L'attività chinastica del mutante Y354F è stata quindi confrontata con quella della HIPK2 nativa e del mutante K221R. A tale scopo abbiamo prodotto in cellule umane H1299 le proteine ricombinanti eGST-HIPK2, eGST-Y354F e eGST-K221R e le abbiamo sottoposte a saggio chinastico in vitro in presenza di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ed abbiamo valutato la loro capacità di auto-fosforilarsi e di fosforilare i substrati esogeni MBP, p53 e p63. La sostituzione della Y del *loop* di attivazione con una F abolisce quasi completamente la capacità della chinasi di fosforilare un substrato non specifico come la proteina MBP (Figura 16 A) e inibisce fortemente la fosforilazione dei due substrati specifici p53 e p63 (Figura 16 B e C). Questi risultati supportano ulteriormente l'idea che la Y354 si comporti come la Y del *loop* di attivazione e che l'inibizione della sua fosforilazione influenzi la capacità di HIPK2 di fosforilare i substrati. Sorprendentemente, però, il mutante Y354F non perde l'attività catalitica su se stesso e mostra un'attività di auto-fosforilazione intermedia tra quella della proteina HIPK2 nativa e quella del mutante K221R (Figura 16 D), indicando che l'inibizione della fosforilazione della Y354 non abolisce per se l'attività catalitica della chinasi.



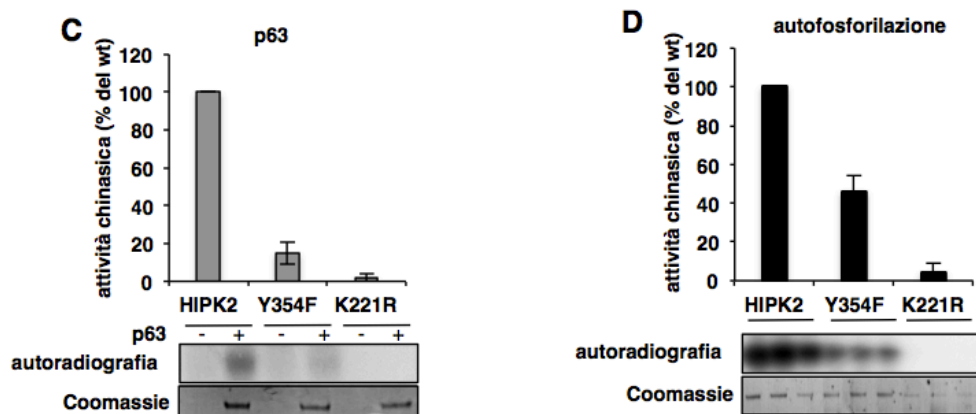
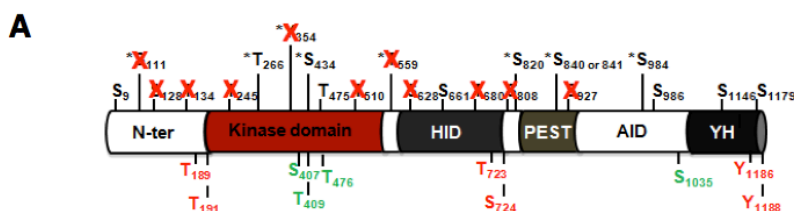


Figura 16. Il mutante Y354F ha una ridotta capacità di auto-fosforilarsi e di fosforilare i substrati. I livelli di fosforilazione di (A) MBP, (B) p53 e (C) p63 da parte delle proteine purificate eGST-HIPK2, Y354F e K221R sono stati valutati attraverso saggi chinasi in vitro in presenza di $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **D)** Analisi dell'attività di auto-fosforilazione delle proteine utilizzate sopra. **A-D)** Sono riportati esempi rappresentativi di autoradiografie con la relativa colorazione con Coomassie. I grafici rappresentano la media con la deviazione standard di almeno tre esperimenti indipendenti.

La fosforilazione della Y354 impedisce l'auto-fosforilazione aberrante in Y e in S/T.

Dato che il mutante Y354F conserva una discreta attività di auto-fosforilazione abbiamo analizzato il suo pattern di fosforilazione attraverso MS/MS. In confronto alla proteina eGST-HIPK2 nativa il mutante Y354F perde 12 dei 22 siti di fosforilazione, 4 dei quali erano di putativa auto-fosforilazione e guadagna nuove S/T fosforilate. (Figura 17 A e Tabella 2 confrontare colonne 2 e 4). In modo sorprendente, quando abbiamo analizzato le stesse proteine in seguito ad incubazione con ATP per massimizzare l'attività di auto-fosforilazione, sono comparse due tirosine fosforilate nel mutante Y354F (Figura 17 A e Tabella 2, confrontare colonna 4 e 5). Al contrario, nella proteina nativa non sono state osservate né differenze nel numero e nella distribuzione dei siti S/T fosforilati né la comparsa di tirosine fosforilate (Tabella 2, confrontare le colonne 2 e 3)



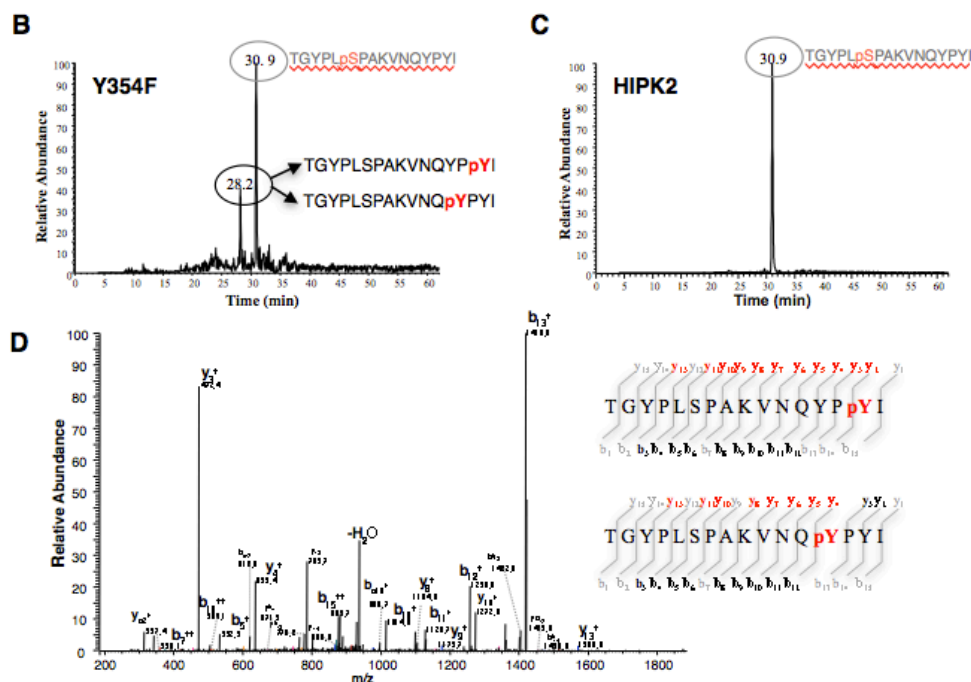


Figura 17. Il mutante Y354F si autofosforila in modo aberrante. A) rappresentazione schematica dei siti di fosforilazione del mutante Y354F. I siti presenti anche nella proteina nativa sono indicati in nero nella parte superiore. I siti persi rispetto alla proteina nativa sono barrati con una croce rossa. I siti guadagnati dal mutante Y354F ed assenti nella nativa sono indicati in basso in colore verde. Infine quelli indicati in rosso sono i siti che compaiono in seguito a saggio chinamico. **B e C)** Profili LC-MS degli ioni relativi ai peptidi fosforilati con la sequenza TGYPLSPAKVNQYPYI acquisiti per le proteine eGST-HIPK2 e Y354F incubate in presenza di ATP. Un picco al tempo di ritenzione di 28.2 min è presente solo nel campione del mutante Y354F incubato con ATP (**B**) mentre è assente nel campione di eGST-HI PK2 (**A**). **D)** È mostrato lo spettro MS/MS relativo a questo picco e corrispondente al fosfo-peptide TGYPLSPAKVNQpYPYI o TGYPLSPAKVNQYPpYI.

L'aumento di fosforilazione in tirosina nel mutante Y354F è stato confermato in Western blot con un anticorpo α -fosfotirosina (Figura 18 A e B). Sorprendentemente, il mutante di delezione Y354F(Δ 1050-1189) che manca della regione C-terminale di HIPK2 che contiene le nuove tirosine fosforilate Y1186 e Y1188 (Tabella 2) mantiene una forte immunoreattività per l'anticorpo α -fosfotirosina come mostrato dagli esperimenti di Western blot (Figura 18 C).

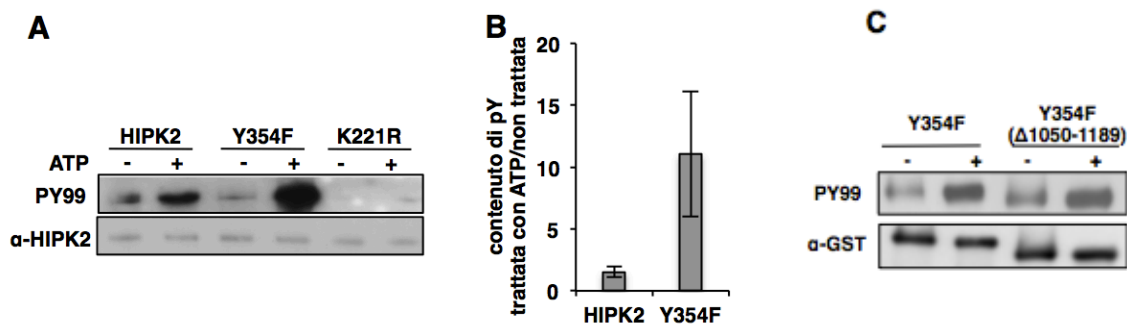


Figura 18. Il mutante Y354F si autofosforila in Y in modo aberrante. A) Le proteine indicate, prodotte e purificate da cellule di mammifero, sono state analizzate prima e dopo saggio chinasi *in vitro* mediante Western blot con l'anticorpo α -pTyr PY99. La normalizzazione è stata effettuata con l'anticorpo α -HIPK2. B) I valori densitometrici di tre esperimenti indipendenti, effettuati come in A, sono riportati come media e deviazione standard del rapporto tra la quantità fosfotirosina nella proteina trattata rispetto alla non trattata. C) Western blot effettuato come in A. La normalizzazione è stata fatta con l'anticorpo α -GST

Questo risultato suggerisce che l'assenza di fosforilazione sulla tirosina del *loop* di attivazione consente ad HIPK2 di mantenere una forte attività tirosina chinasi fuori bersaglio. Per confermare questa ipotesi, abbiamo prodotto in batteri la proteina ricombinante GST-HIPK2(158-557), costituita dal solo dominio chinasi e i rispettivi mutanti Y354F(158-557) e K221R(158-557). Le tre proteine sono state purificate mediante GST pull-down ed analizzate in Western blot con l'anticorpo α -fosfotirosina. I risultati mostrano un forte segnale nella HIPK2 nativa che bona fide fosforila la Y354, ma anche nel mutante Y3554F (Figura 19) indicando che in assenza di fosforilazione sulla Y del *loop* di attivazione possono essere fosforilati differenti residui di tirosina.

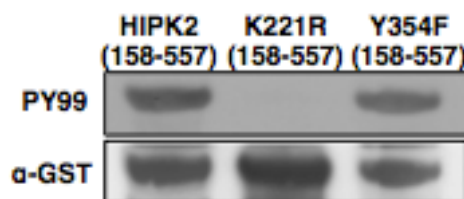
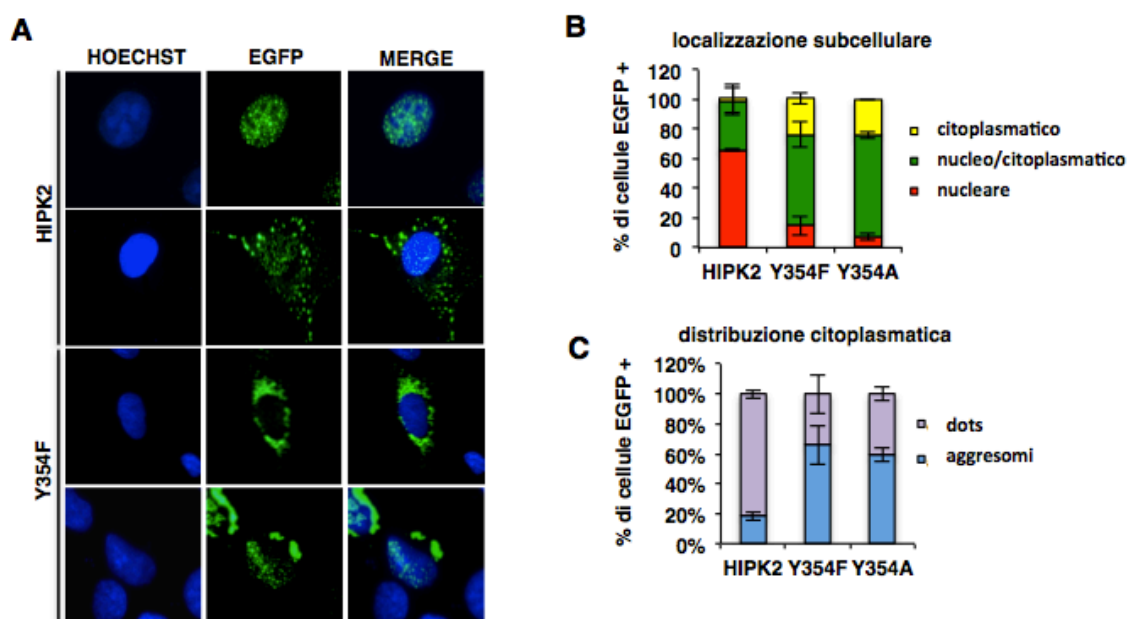


Figura 19. Il mutante Y354F si autofosforila in Y in modo aberrante. Le proteine indicate sono state prodotte in batteri, purificate mediante GST pull-down e analizzate in Western blot con l'anticorpo α -pTyr PY99

La fosforilazione della tirosina Y354 influenza la localizzazione subcellulare di HIPK2

Per valutare le implicazioni funzionali della mancanza di fosforilazione sulla Y354, abbiamo trasfettato transientemente le cellule di osteosarcoma umano U2OS per indurre l'espressione delle proteine di fusione EGFP-HIPK2 nativa e il mutante EGFP-Y354F. Dopo la trasfezione, le cellule sono state fissate e sono state contate le cellule positive alla EGFP con una localizzazione nucleare, nucleo/citoplasmatica o esclusivamente citoplasmatica. Come atteso (Rinaldo et al., 2008 e Figura 20 A, B e C), EGFP-HIPK2 mostra una distribuzione prevalentemente nucleare e organizzata in substrutture puntiformi dette *dots* e in minor parte una distribuzione nucleo/citoplasmatica sempre disposta in *dots*. Sorprendentemente, il mutante Y354F mostra una distribuzione opposta a quella descritta per la proteina nativa, con una localizzazione prevalentemente nucleo/citoplasmatica o esclusivamente citoplasmatica. Inoltre la frazione citoplasmatica del mutante Y354F mostra la tendenza a formare *dots* di dimensioni maggiori ed aggregati perinucleari (Figura 20 A, B e C).

Per confermare le diverse distribuzioni osservate negli esperimenti di fluorescenza, abbiamo effettuato un'analisi mediante Western blot su frazioni cellulari nucleari e citoplasmatiche. I risultati mostrano che il mutante Y354F ha una maggiore tendenza ad accumularsi nel citoplasma (Figura 20 D).



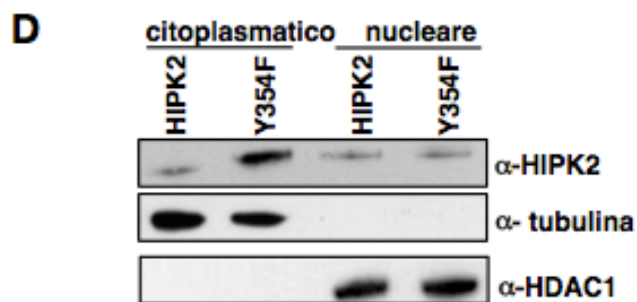
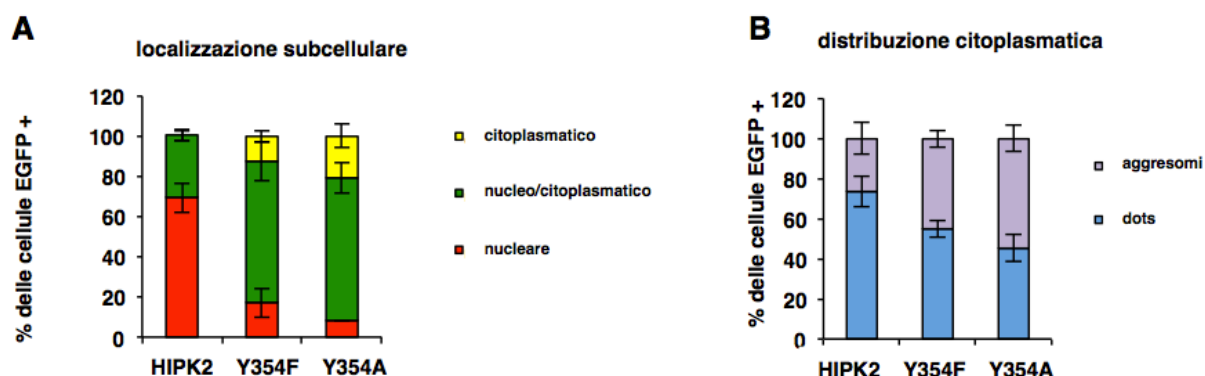


Figura 20. Il mutante non fosforilabile Y354F si localizza nel citoplasma. A,B,C) Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione che codificano le proteine indicate. A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate, colorate con Hoechst per visualizzare il DNA ed analizzate per l'auto-fluorescenza della EGFP. In (A) sono mostrate delle immagini rappresentative. Per ogni proteina indicata sono riportate le percentuali di cellule con localizzazione nucleare, nucleo/citoplasmatica o citoplasmatica (B) o con distribuzione citoplasmatica con *dots* o aggregata (C). I valori sono riportati come media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. D) Cellule U2OS sono state trasfettate come sopra, sottoposte a frazionamento nucleo/citoplasma e analizzate per Western blot con l'anticorpo α-HIPK2. Gli anticorpi α-tubulina and α-HDAC1 sono stati utilizzati come marcatori della frazione citoplasmatica e nucleare.

Per escludere che la diversa localizzazione cellulare osservata per il mutante Y354F fosse dovuta ad un artefatto legato alla specifica sostituzione aminoacidica, abbiamo ripetuto gli esperimenti di localizzazione utilizzando un mutante in cui la Y354 fosse stata sostituita con una alanina (Figura 21). Questi esperimenti mostrano che il mutante Y354A si comporta come il mutante Y3554F. Infine abbiamo condotto esperimenti analoghi anche utilizzando metà del DNA utilizzato per trasfettare le cellule in figura 20 A-C e anche utilizzando una linea cellulare diversa, le cellule di tumore del colon RKO. Entrambi questi esperimenti hanno confermato che la mancanza di fosforilazione della Y354 influenza la localizzazione subcellulare di HIPK2 (Figura 21 C e D)



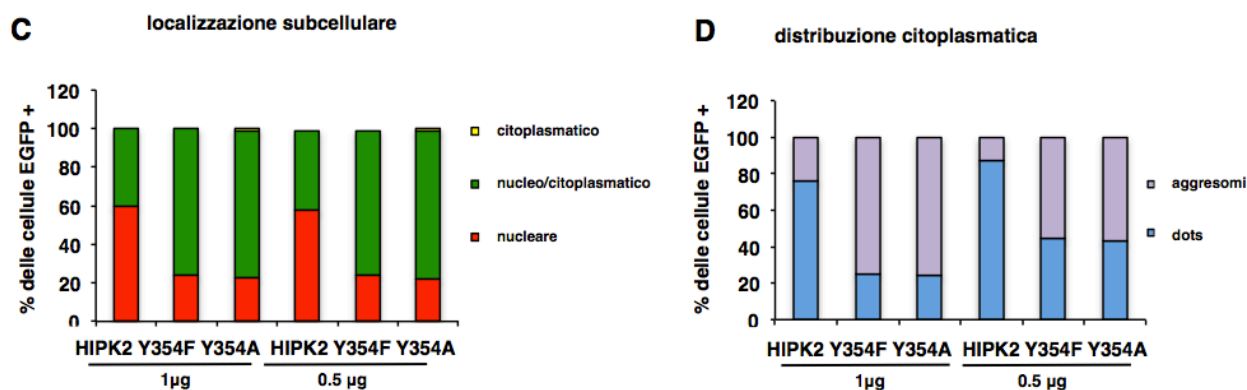


Figura 21. Localizzazione subcellulare del mutante Y354F. A e B) Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con la metà del DNA usato negli esperimenti in figura 20. A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate, colorate con Hoechst per visualizzare il DNA ed analizzate per l'auto-fluorescenza della EGFP. Per ogni proteina indicata sono riportate le percentuali di cellule con localizzazione nucleare, nucleo/citoplasmatica o citoplasmatica (A) o con distribuzione citoplasmatica con *dots* o aggregata (B). I valori sono riportati come media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. C e D) Cellule RKO sono state trasfettate transientemente con 1 o 0,5 µg dei vettori d'espressione codificanti le proteine indicate e analizzate come sopra.

Successivamente ci siamo chiesti se l'inibizione della fosforilazione della Y354 nella HIPK2 nativa inducesse un fenotipo simile. Dato che l'inibitore Purvalanol A inibisce l'auto-fosforilazione in tirosina di HIPK2 in vitro (vedi Figura 15), abbiamo valutato la localizzazione subcellulare della proteina EGFP-HIPK2 espressa transientemente in cellule U2OS in presenza o in assenza di purvalanol A (Figura 22 A e B). Analogamente, abbiamo trattato con purvalanol A fibroblasti umani e successivamente è stata valutata la localizzazione di HIPK2 endogena mediante immunofluorescenza (Figura 22 C). Come mostrato in Figura 22 si può osservare una forte delocalizzazione citoplasmatica della proteina nativa solo in seguito al trattamento con purvalanol A, confermando che le osservazioni fatte con i mutanti non fosforilabili Y354F/A non sono dovute ad artefatti indotti dalla mutazione. Il fattore nucleare NF-YA, utilizzato come controllo, non mostra alcuna variazione nella localizzazione in seguito a trattamento con il purvalanol A (Figura 22 D). Inoltre, abbiamo osservato che tale delocalizzazione nel citoplasma è una caratteristica propria di HIPK2 dato che il corrispettivo mutante di DYRK1A, Y321F conserva la sua localizzazione nucleare (Figura 22 E).

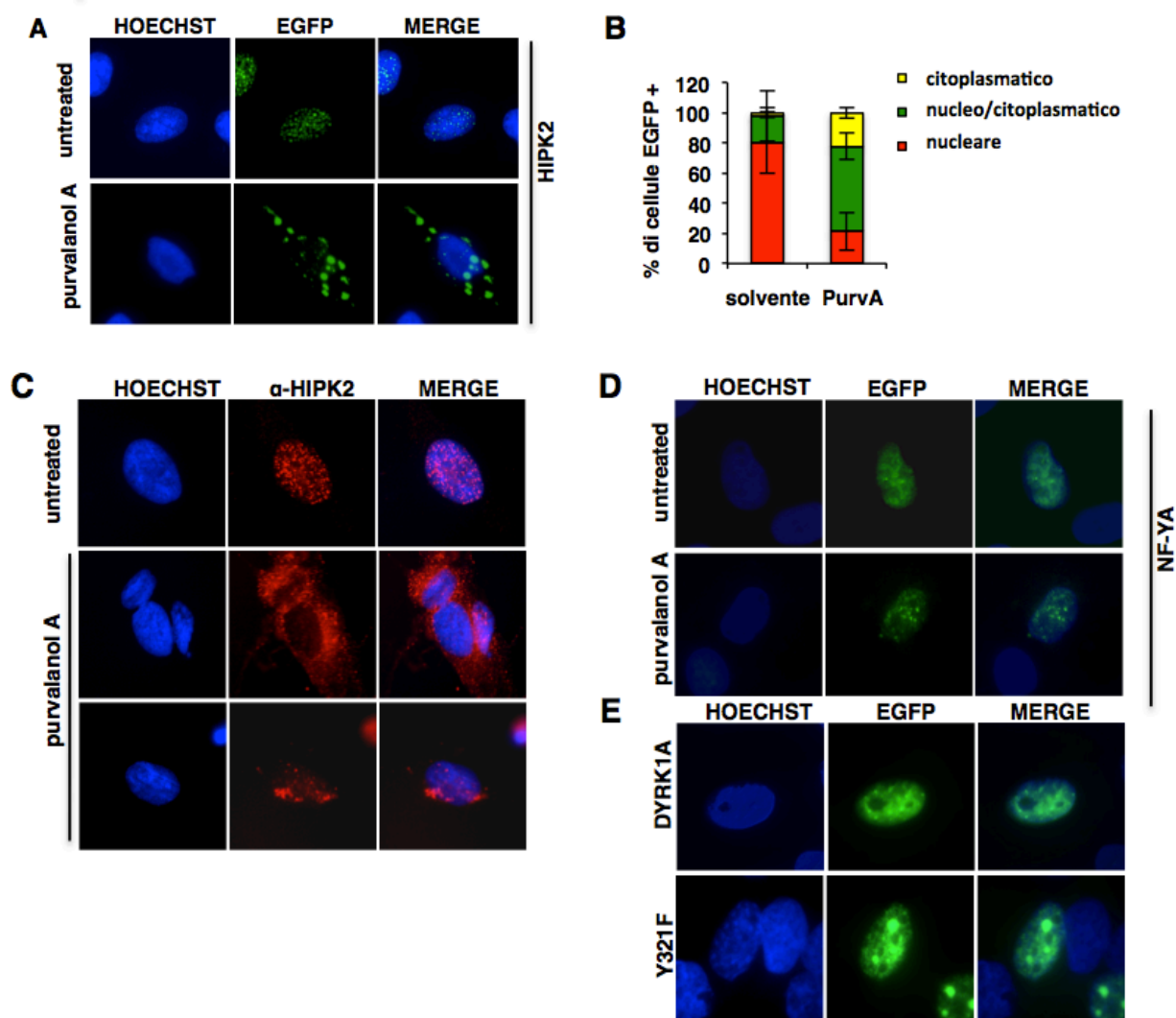


Figura 22. L'inibizione della fosforilazione della Y del loop di attivazione induce la delocalizzazione di HIPK2 nel citoplasma. A) Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con il vettore d'espressione EGFP-HIPK2 ed incubate per 16 ore in presenza o in assenza dell'inibitore Purvalanol A alla concentrazione di 100 μ m. Successivamente le cellule sono state fissate, colorate con Hoechst per visualizzare il DNA ed analizzate per l'auto-fluorescenza della EGFP. In (A) sono mostrate delle immagini rappresentative. Per ogni proteina indicata sono riportate le percentuali di cellule con localizzazione nucleare, nucleo/citoplasmatica o citoplasmatica (B). I valori sono riportati come media e deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. C) Fibroblasti umani sono stati incubati per 72 ore in presenza o in assenza dell'inibitore Purvalanol A alla concentrazione di 100 μ m. Successivamente le cellule sono state fissate, colorate con Hoechst per visualizzare il DNA ed immunodecorate per l'HIPK2 endogena con un anticorpo α -HIPK2. Sono mostrate immagini rappresentative. D) Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con il vettore di espressione per il fattore NF-YA e sono state incubate per 16 ore in presenza o in assenza dell'inibitore Purvalanol A alla concentrazione di 100 μ m. Successivamente le cellule sono state fissate, colorate con Hoechst per visualizzare il DNA ed analizzate per l'auto-fluorescenza della EGFP. E) Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione per la proteina EGFP-DYRK1A o per il mutante Y321F ed analizzate come in D.

È interessante notare che, nonostante l'assenza di fosforilazione sulla tirosina Y354 (Tabella 1), in esperimenti analoghi a quelli descritti in precedenza, il mutante K221R mantiene una localizzazione nucleare (Rinaldo et al., 2008 e Figura 23). Tale comportamento suggerisce che la delocalizzazione nel citoplasma osservata in seguito all'inibizione della fosforilazione in tirosina potrebbe essere

dovuta all'attività di auto-fosforilazione aberrante piuttosto che ad una generale inibizione dell'attività chinastica. Infatti, questa ipotesi è fortemente supportata dall'osservazione che il doppio mutante HIPK2K221R/Y354F mostra una localizzazione nucleare confrontabile con quella del K221R (Figura 23).

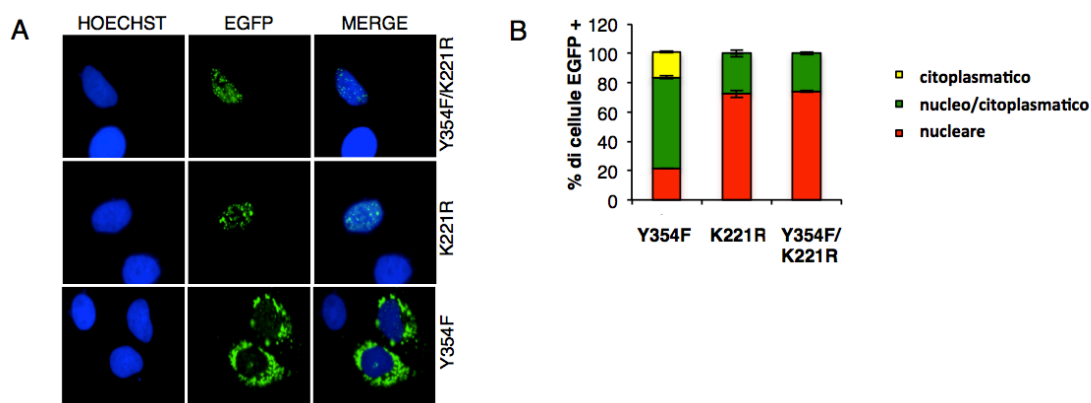


Figura 23. L'inibizione della fosforilazione della Y del *loop* di attivazione induce la delocalizzazione di HIPK2 nel citoplasma. A, B) Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione che codificano le proteine indicate. A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate, colorate con Hoechst per visualizzare il DNA ed analizzate per l'auto-fluorescenza della EGFP. In (A) sono mostrate delle immagini rappresentative. Per ogni proteina indicata sono riportate le percentuali di cellule con localizzazione nucleare, nucleo/citoplasmatica o citoplasmatica (B).

La localizzazione citoplasmatica del mutante Y354F mostra le caratteristiche degli aggregomi e ricorda la delocalizzazione di HIPK2 osservata in alcuni tumori umani.

La distribuzione citoplasmatica in *dots* o aggregati che abbiamo osservato nella HIPK2 non fosforilata sulla Y354 ricorda la delocalizzazione trovata in alcuni carcinomi alla mammella e leucemie (Pierantoni et al., 2007; Wee et al., 2008). Perciò, abbiamo deciso di analizzare ulteriormente queste differenti localizzazioni subcellulari in saggi di co-localizzazione mediante immunofluorescenza con anticorpi specifici per gli organelli cellulari. Abbiamo osservato che la fluorescenza del mutante EGFP-Y354F non co-localizza con il segnale dato dall'anticorpo anti-calreticulina, GM130 o dal colorante Mitotracker, utilizzati rispettivamente per visualizzare il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi ed i mitocondri (Figura 24).

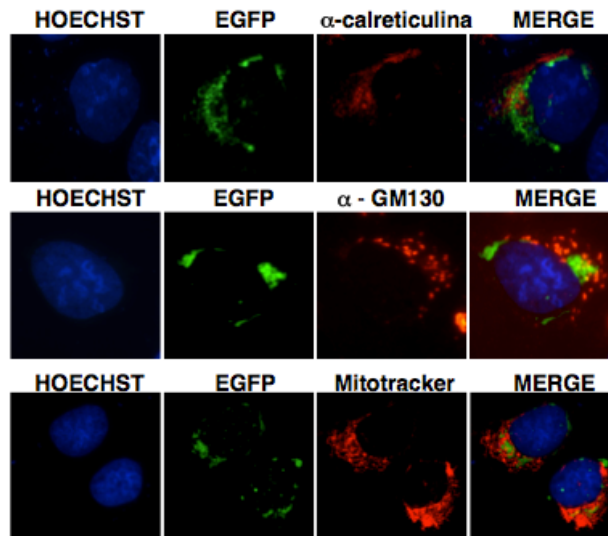


Figura 24. Il mutante Y354F si accumula nel citoplasma. Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con il vettore di espressione per la proteina EGFP-HIPK2. A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate e immunodecorate con gli anticorpi α -calreticulina (rosso, pannello superiore), α - GM130 (rosso, pannello di mezzo) o colorate con il Mitotracker (rosso, pannello inferiore). Il DNA è stato visualizzato mediante Hoechst e la co-localizzazione con il mutante Y354F è stata valutata grazie all'auto-fluorescenza della EGFP.

Al contrario, abbiamo potuto osservare una co-localizzazione con il marcatore dei lisosomi anti-LAMP2 e con il segnale dato dall'anticorpo anti-ubiquitina e una stretta vicinanza al segnale della γ -tubulina, utilizzata per visualizzare l'organizzatore dei microtubuli (Figura 25). Questa distribuzione è compatibile con quella degli "agresomi" (Rodriguez-Gonzalez et al., 2008), i depositi intracellulari coinvolti nell'eliminazione delle proteine non strutturate correttamente e/o aggregate (Chin et al., 2010).

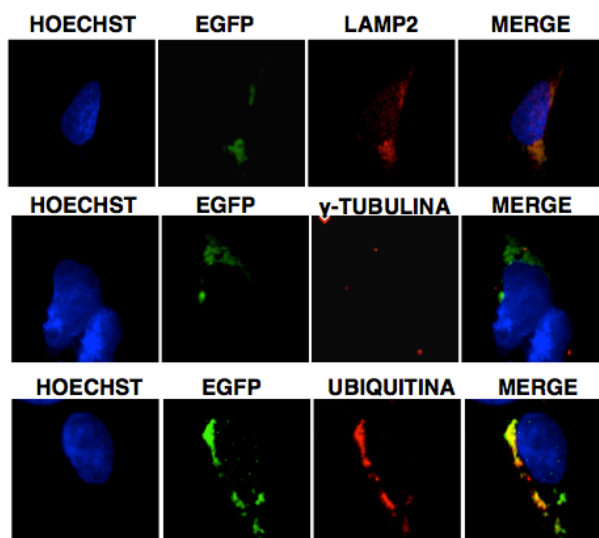


Figura 25. Il mutante Y354F si accumula in agresomi. Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con il vettore di espressione per la proteina EGFP-HIPK2. A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate e

immunodecorate con gli anticorpi α -LAMP2 (rosso, pannello superiore), α - γ -tubulina (rosso, pannello di mezzo) o α -ubiquitina (rosso, pannello inferiore). Il DNA è stato visualizzato mediante Hoechst e la co-localizzazione con il mutante Y354F è stata valutata grazie all'auto-fluorescenza della EGFP.

Poiché è noto che le proteine depositate negli aggresomi sono parzialmente insolubili (Garcia-Mata et al., 1999), abbiamo confrontato la solubilità cellulare della proteina nativa EGFP-HIPK2 con quella del mutante EGFP-Y354F. A tal fine, cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori veicolanti il cDNA codificante EGFP-HIPK2 o EGFP-Y354F in modo da avere quantità uguali di mRNA, come indicato dai dati dei real-time PCR (Figura 26 pannello superiore). Successivamente sono stati analizzati mediante Western blot i livelli delle proteine nei lisati cellulari totali o nelle frazioni solubile ed insolubile. I risultati mostrano che EGFP-HIPK2 è presente quasi esclusivamente nella frazione solubile mentre circa il 50% della proteina Y354F si trova nella frazione insolubile (Figura 26).

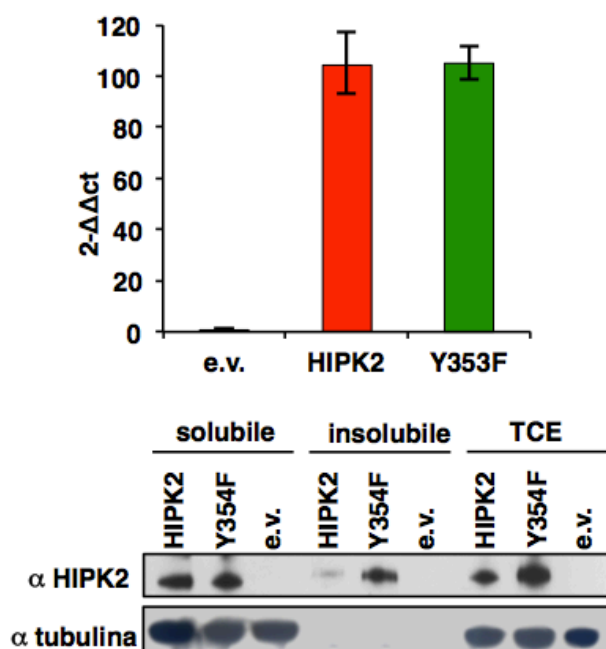


Figura 26. La proteina Y354F è insolubile. Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione per le proteine EGFP-HIPK2 e EGFP Y354F o con il vettore vuoto (e.v.). A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e suddivise in aliquote per ottenere l'mRNA, l'estratto cellulare totale (TCE) e le frazioni solubile e insolubile. I livelli di mRNA sono stati analizzati mediante Real-Time PCR (pannello superiore). TCE, frazione solubile e frazione insolubile sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati in Western blot con un anticorpo α -HIPK2 (pannello inferiore). La normalizzazione è stata effettuata con un anticorpo α -tubulina.

Per valutare ulteriormente se la delocalizzazione citoplasmatica fosse effettivamente dovuta al deposito negli aggresomi, abbiamo espresso transientemente in cellule U2OS la proteina EGFP-HIPK2 in presenza dell'inibitore del proteosoma MG132. Le cellule sono state quindi fissate ed analizzate per immunofluorescenza con l'anticorpo anti-ubiquitina (Figura 27). Parallelamente

abbiamo analizzato mediante Western blot la presenza della proteina nelle frazioni solubile ed insolubile. In seguito all'inibizione del proteosoma si ha un forte aumento della quantità di HIPK2 nella frazione insolubile (Figura 27 A) e uno spostamento dai *dots* nucleari negativi all'ubiquitina agli aggregati citoplasmatici ubiquitilati (Figura 27 B e C). Inoltre, analisi mediante immunofluorescenza di cellule tumorali con un'elevata presenza di HIPK2 citoplasmatica come le cellule leucemiche HEL hanno mostrato una forte co-localizzazione degli aggregati citoplasmatici formati dalla proteina endogena con l'ubiquitina (Figura 27 D). Ciò supporta l'idea che la formazione di aggresomi, come quella indotta dall'inibizione della fosforilazione sulla Y354, potrebbe contribuire ad inattivare le funzioni di oncosoppressore di HIPK2 nei tumori umani.

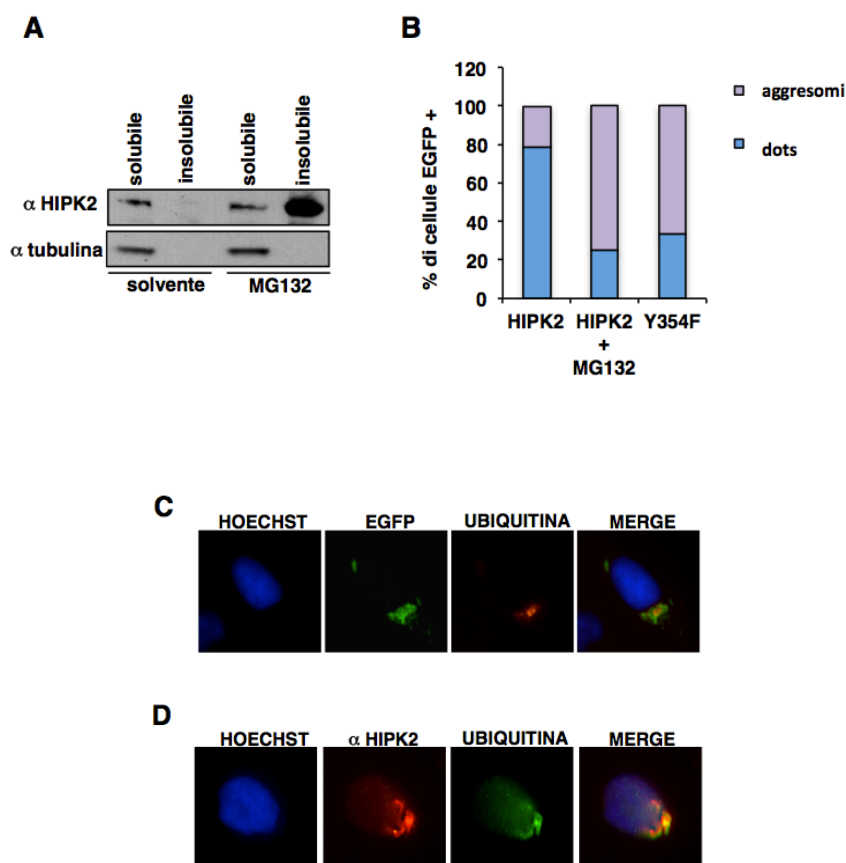
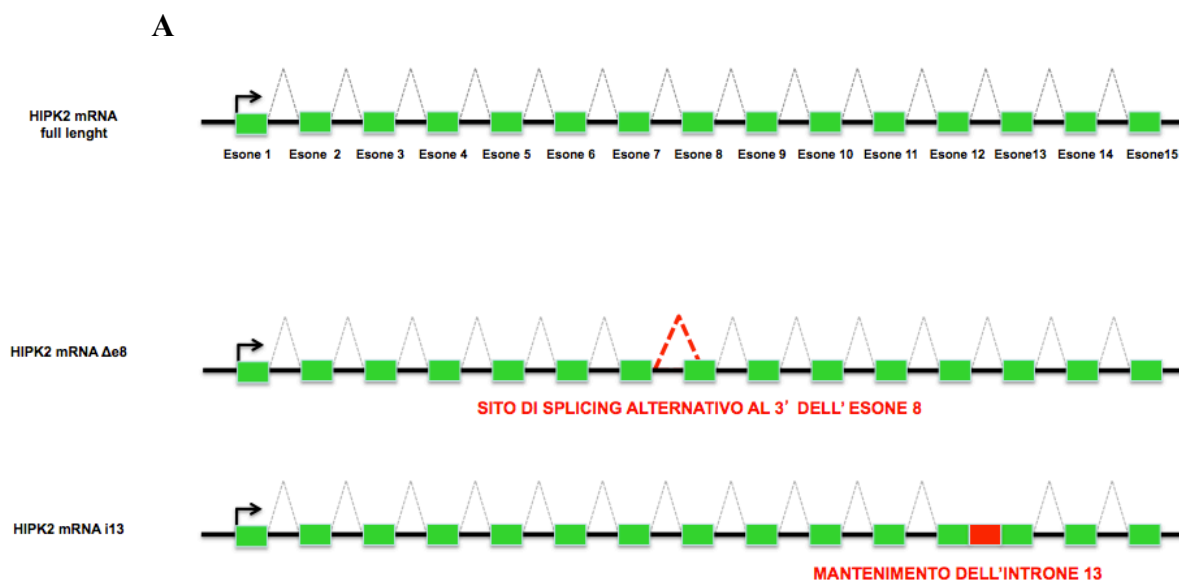


Figura 27. L'inibizione del proteosoma induce l'accumulo di HIPK2 negli aggresomi. **A)** Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con il vettore di espressione per la proteina EGFP-HIPK2 ed incubate per 16 ore in presenza o in assenza di MG132 alla concentrazione di 5 μ M. Le cellule sono state raccolte e suddivise in aliquote per ottenere le frazioni solubile ed insolubile. I campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati in Western blot con un anticorpo α -HIPK2. La normalizzazione è stata effettuata con un anticorpo α -tubulina. **B)** Cellule U2OS sono state trasfettate transientemente con il vettore di espressione per la proteina EGFP-HIPK2 ed incubate per 16 ore in presenza o in assenza di MG132 alla concentrazione di 5 μ M o trasfettate transientemente con il vettore di espressione per la proteina EGFP-Y354F. Per ogni proteina indicata sono riportate le percentuali di cellule con distribuzione citoplasmatica con *dots* o aggregata. **C)** Cellule U2OS sono state trasfettate e trattate come in (A). A 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate e immunodecorate con α -ubiquitina (rosso). Il DNA è stato visualizzato mediante

Hoechst e la colocalizzazione con il mutante Y354F è stata valutata grazie all'auto-fluorescenza della EGFP. **D)** Cellule leucemiche HEL sono state fissate e immunodecorate con α -HIPK2 (rosso) e α -ubiquitina (verde). Il DNA è stato visualizzato mediante Hoechst.

HIPK2 viene regolata mediante *splicing* alternativo

Per verificare se il gene *HIPK2* fosse soggetto a regolazione mediante *splicing* alternativo abbiamo iniziato con un'analisi *in silico* a partire da database di sequenze annotate. In particolare, interrogando il "Reference Sequence (RefSeq) database, una collezione di sequenze nucleotidiche annotata e curata dal National Center for Biotechnology Information (NCBI), emerge che oltre all'RNA messaggero di HIPK2 che chiameremo HIPK2 *full-length* (HIPK2 F.L.) che consiste di 15 esoni, esiste un prodotto di *splicing* alternativo più corto rispetto alla forma *full-length*. Questa isoforma che d'ora in avanti sarà chiamata HIPK2 Δ e8 è il risultato dell'uso di un sito di *splicing* al 3' alternativo. Nella rimozione dell'introne posizionato tra l'esone sette e l'esone otto anziché utilizzare il sito di *splicing* canonico posto alla giunzione introne-esone viene utilizzato un sito di *splicing* alternativo posto all'interno dell'esone 8 con conseguente perdita di 81 paia di basi (Figura 28 A). La proteina che ne dovrebbe risultare mancherebbe di 27 aminoacidi nel Homeodomain Interacting Domain ed avrebbe un peso molecolare di circa 128KDa rispetto ai 130 KDa della HIPK2 F.L. (Figura 28 B).



B

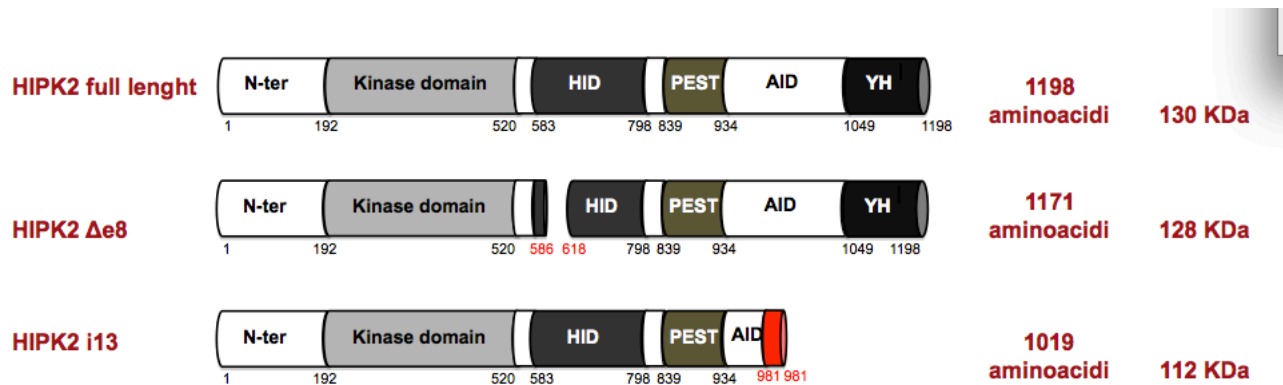


Figura 28. Forme alternative di *splicing* di HIPK2 . A) Rappresentazione schematica dei due eventi di *splicing* alternativo del messaggero di HIPK2. I rettangoli verdi raffigurano gli esoni e le linee nere gli introni. **B)** Rappresentazione schematica dei putativi prodotti proteici dei messaggeri indicati in (A).

Per ampliare la nostra analisi abbiamo deciso di estendere la nostra ricerca anche a database di ESTs (expressed sequence tag), cioè brevi sequenze di DNA, tipicamente di 500-800 nucleotidi, prodotte dal sequenziamento *one-shot* di cloni di cDNA. A tale scopo ci siamo avvalsi della banca dati TromER (Transcriptome analysis database) sviluppato allo Swiss institute of Bioinformatics. In particolare il programma Tromer (transcriptome analyzer) automatizza la ricostruzione di trascritti mappando sequenze di RNA di varia provenienza (ESTs, RefSeq mRNAs) su sequenze di DNA genomico provenienti da NCBI.



Figura 29. Output grafico relativo al gene HIPK2 prodotto dal programma Tromer.

In figura 29 è mostrato l'output grafico di Tromer per il gene *HIPK2* umano. Il triangolo verde indica il sito di inizio della trascrizione mentre quelli rossi i siti di stop; i pentagoni azzurri rappresentano i siti donatori o accettori di *splicing*; le linee grigie raffigurano le sequenze nucleotidiche (esoni ed introni) con un codice colori che associa la gradazione di grigio alla frequenza con cui la tale sequenza è rappresentata nelle banche dati: maggiore è l'intensità del colore più alta è la frequenza. Analizzando il grafico si riconosce l'evento di *splicing* al livello dell'esone 8 (indicato con la freccia rossa) inoltre si può notare la presenza di due siti di

terminazione alternativi (T0 e T1) e di due *splicing* alternativi al 3' del messaggero (indicati con le frecce nere). Abbiamo deciso di concentrarci sugli eventi di *splicing* trovati in banca dati e provenienti da almeno 10 diversi esperimenti. Oltre all'isoforma HIPK2 Δe8 abbiamo individuato un'ulteriore ipotetica isoforma di *splicing* (Figura 28 A) derivante dal mantenimento dell'introne 13 nella sequenza dell'mRNA (indicata in Figura 29 da una freccia verde e dal sito di terminazione T1). Questa isoforma, chiamata HIPK2 i13, a causa di un codone di stop prematuro dopo 89 paia di basi, si dovrebbe tradurre in una proteina priva della parte C-terminale e con una nuova sequenza di 27 aminoacidi non presente nella proteina nativa. Questa isoforma proteica, dal peso di circa 100 KDa, perderebbe il sito di ubiquitilazione da parte di MDM2 e il dominio di auto-inibizione, suggerendo che possa essere una forma più stabile e più attiva simile a quella prodotta dal taglio caspatico in seguito a danno al DNA (Figura 28 B).

Infine, per conferma, abbiamo cercato manualmente la presenza dei due *splicing* alternativi negli allineamenti delle diverse EST al DNA genomico di HIPK2. In figura 30 sono mostrati due particolari dell'allineamento condotto utilizzando UCSC genome browser e in particolare sono indicate le EST contenenti l'isoforma Δe8 (frecce rosse) o i13 (frecce verdi) rispetto a quelle contenenti la forma F.L. (frecce blu).

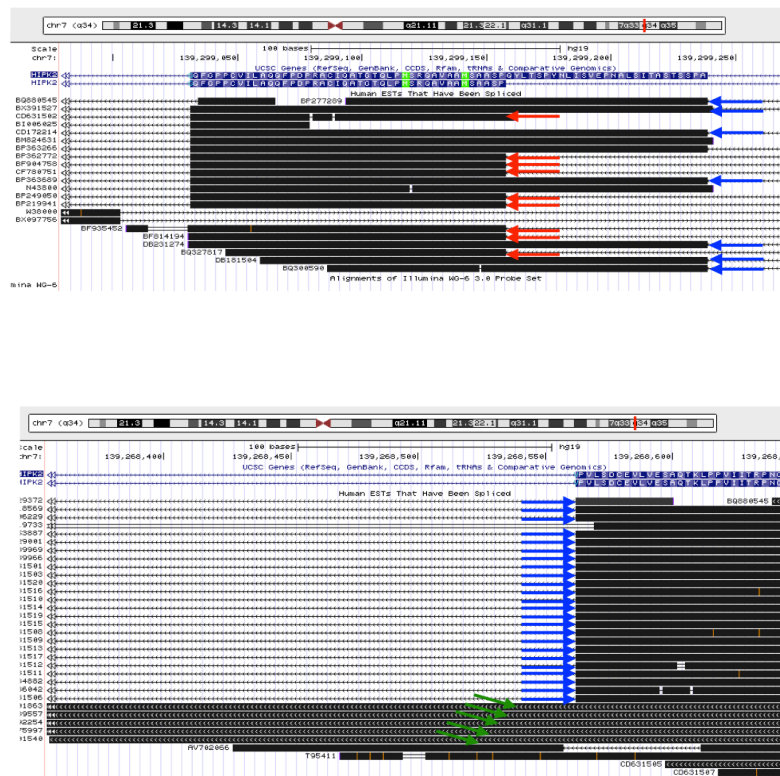


Figura 30. Allineamento delle EST al DNA genomico di HIPK2 effettuato da genome browser di UCSC. Nel pannello superiore è mostrato l'allineamento relativo allo *splicing* alternativo dell'esone 8, nel pannello inferiore quello relativo al mantenimento dell'introne 13.

Queste analisi *in silico* indicano che il gene *HIPK2* umano è soggetto ad almeno due diversi eventi di *splicing* alternativo, tuttavia non ci indicano se i due eventi sono combinati tra loro o sono mutuamente esclusivi. Sulla base di questo tipo di analisi, considerando anche la misura ridotta delle EST (500-800 paia di basi) non possiamo escludere l'esistenza di una quarta forma, *HIPK2* Δ e8/i13 (Figura 31) derivante dalla combinazione dei due eventi.

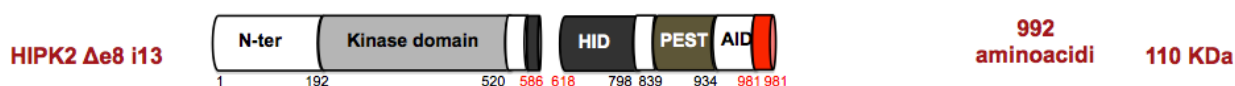


Figura 31. Forme alternative di *splicing* di *HIPK2* Rappresentazione schematica di un ipotetico quarto prodotto proteico dato dalla combinazione dei due eventi di *splicing*

Gli *splicing* alternativi dell'esone 8 e dell'introne 13 si verificano in diversi tipi cellulari

Sulla base delle analisi *in silico* abbiamo condotto una serie di esperimenti di RT-PCR per confermare in cellule l'esistenza dei due eventi di *splicing* alternativo. A tal fine sono state disegnate due coppie di primers (Figura 32). Una prima coppia, costituita da un oligonucleotide *forward* complementare a parte dell'esone sei e un *reverse* complementare a parte dell'esone otto genera due prodotti di PCR: uno di 467 paia di basi relativo alle isoforme di *HIPK2* contenenti l'esone 8 (*HIPK2* F.L. e *HIPK2* i13) ed uno, più piccolo, di 386 paia di basi relativo alle isoforme mancanti di parte dell'esone 8 (*HIPK2* Δ e8 e *HIPK2* Δ e8/i13). La seconda coppia, specifica per le isoforme di *HIPK2* che mantengono l'introne 13, è formata da un oligonucleotide *forward* complementare a parte dell'esone 11 e uno *reverse* complementare alla sequenza nucleotidica guadagnata dal mantenimento dell'introne e, di conseguenza esclusiva di queste isoforme (*HIPK2* i13 e *HIPK2* Δ e8/i13). È noto che lo *splicing* alternativo può essere tessuto specifico o legato a

particolari condizioni fisiologiche come lo sviluppo o il differenziamento e che in cellule tumorali sono state riscontrate delle alterazioni. Abbiamo quindi deciso di analizzare il pattern di *splicing* alternativo in diversi tipi cellulari. In particolare sono state analizzate due linee cellulari tumorali di origine epiteliale: le cellule di carcinoma polmonare H1299 e le cellule di carcinoma del colon HCT116. Inoltre sono stati analizzati fibroblasti umani primari o immortalizzati con hTERT e infine linfociti del sangue periferico quiescenti o stimolati a proliferare con la PHA. L'RNA totale è stato estratto dai diversi tipi cellulari e successivamente è stato retrotrascritto, sottoposto a PCR ed analizzato su gel di agarosio. I risultati mostrano che lo *splicing* alternativo dell'esone 8 e il mantenimento dell'introne 13 sono eventi che si verificano sia nelle cellule primarie sia in quelle immortalizzate o tumorali. Al contrario, è interessante notare che il mantenimento dell'introne 13 nel messaggero sia assente nei linfociti del sangue periferico quiescenti e venga indotto in seguito ad uno stimolo proliferativo (Figura 32).

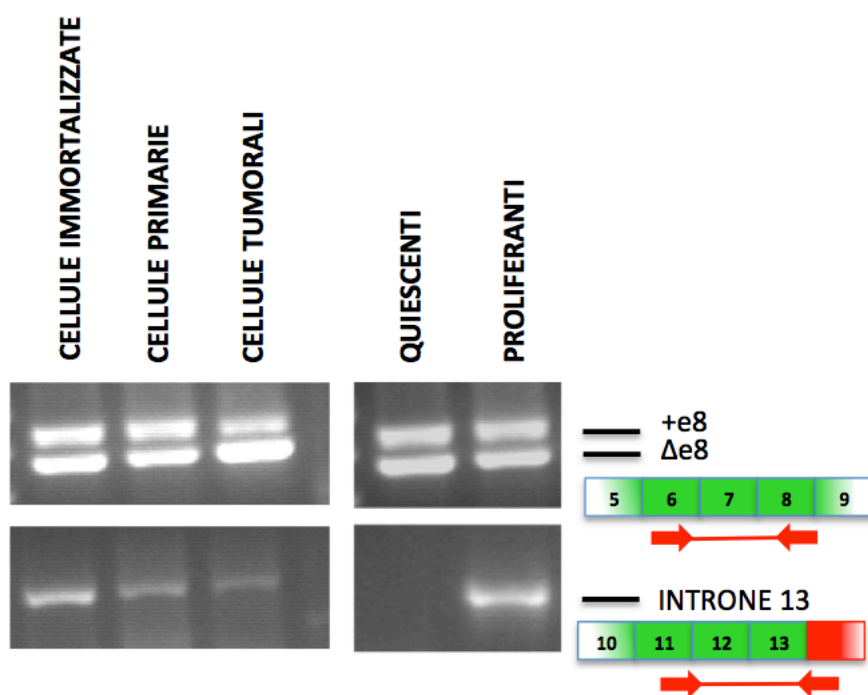


Figura 32. Gli *splicing* alternativi dell'esone 8 e dell'introne 13 si verificano in diversi tipi cellulari . Analisi di RT-PCR effettuata nei tipi cellulari indicati. L'mRNA totale è stato estratto, retrotrascritto e amplificato con coppie di primers a cavallo dell'esone 8 (pannelli superiori) o specifiche per il mantenimento dell'introne 13 (pannelli inferiori). La posizione dei primers rispetto agli eventi di *splicing* è schematizzata nel pannello a sinistra.

Gli eventi di *splicing* non sono combinati e le diverse isoforme si regolano reciprocamente.

Per caratterizzare ulteriormente lo *splicing* alternativo del gene HIPK2 sono stati condotti esperimenti di interferenza specifica dell'RNA. A tal fine sono stati disegnati degli *small interfering*

RNA (siRNA) specifici per ciascuno *splicing* alternativo. In particolare è stato disegnato un siRNA complementare alla nuova giunzione esone-esone che si crea nelle isoforme mancanti di parte dell'esone 8 e quindi specifico per queste ultime. Un secondo siRNA specifico per le isoforme HIPK2 contenenti parte dell'introne 13 si appaia con la sequenza derivante dal mantenimento dell'introne e quindi presente esclusivamente in queste isoforme (Figura 33 A).

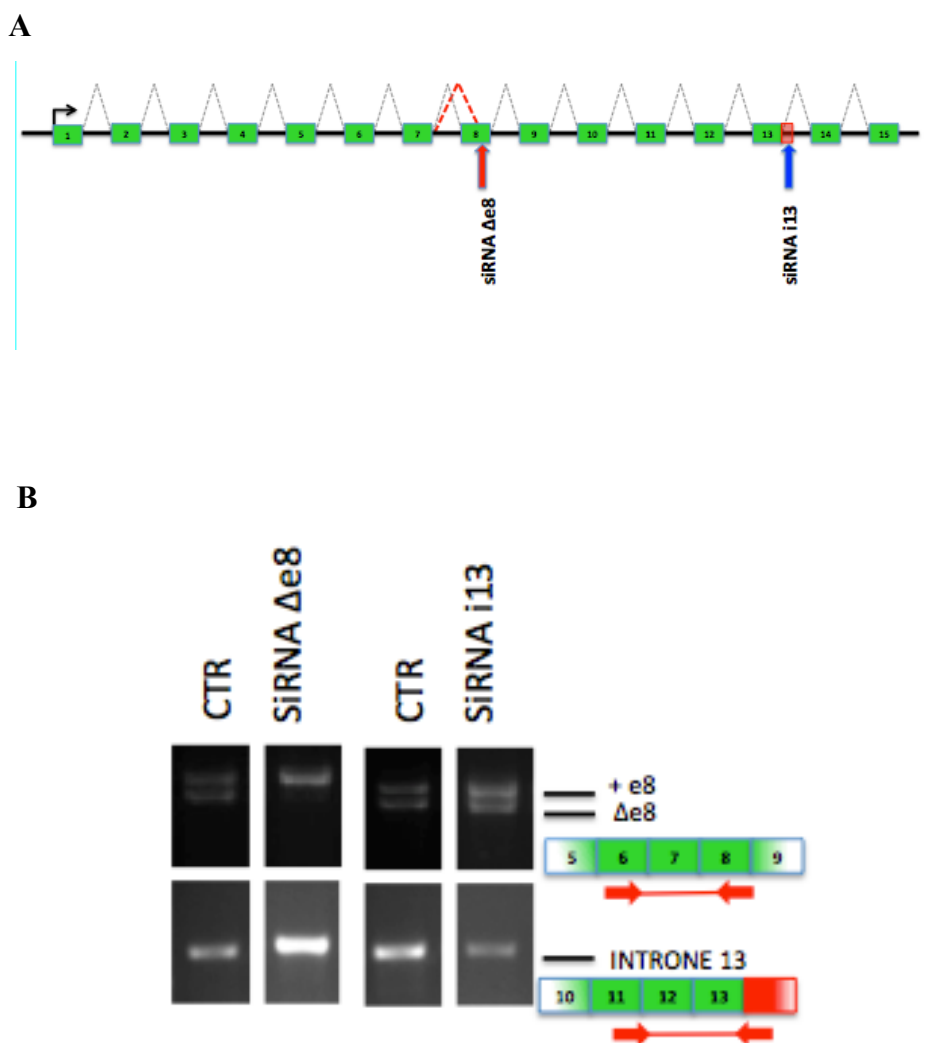


Figura 33. Gli eventi di *splicing* non sono combinati e le diverse isoforme si regolano reciprocamente. A) Rappresentazione schematica della posizione dei due siRNA specifici per l'mRNA di HIPK2. I rettangoli verdi raffigurano gli esoni e le linee nere gli introni. **B)** Analisi di RT-PCR effettuata in fibroblasti umani immortalizzati. L'mRNA totale è stato estratto, retrotrascritto e amplificato con coppie di primers a cavallo dell'esone 8 (pannelli superiori) o specifiche per il mantenimento dell'introne 13 (pannelli inferiori). La posizione dei primers rispetto agli eventi di *splicing* è schematizzata nel pannello a sinistra.

Fibroblasti umani immortalizzati sono stati interferiti per 120 ore con i siRNA descritti sopra e, successivamente sono stati condotti esperimenti di RT-PCR analoghi a quelli descritti in precedenza. Quando gli esperimenti di interferenza vengono condotti con l'siRNA $\Delta e8$ possiamo notare la scomparsa della banda relativa alle forme mancanti dell'esone 8, indicativo di una buona efficienza di interferenza, ma anche un contemporaneo aumento dei livelli di messaggero relativi

alle forme contenenti l'esone 8 e l'introne 13 (Figura 33 B). L'aumento dei livelli di mRNA relativo alle forme contenenti l'introne 13 in seguito all'interferenza con un siRNA specifico per le forme $\Delta e8$ suggerisce fortemente che non esista una forma combinata HIPK2 $\Delta e8$ i13. D'altra parte, questo aumento dei livelli del messaggero della forma i13 in seguito ad interferenza con il siRNA $\Delta e8$ insieme al parallelo aumento dei livelli della forma contenente l'esone 8 indica l'esistenza di una regolazione reciproca tra le tre isoforme. Analogamente, interferendo con i13, sebbene ci sia un'efficienza di interferenza nettamente inferiore, si può notare un leggero aumento dei livelli di entrambe le forme risultanti dallo *splicing* dell'esone 8 (+e8 e -e8), indicando ulteriormente una regolazione tra le diverse isoforme e l'assenza di forme combinate.

Splicing alternativo e modificazioni post-traduzionali cooperano nella regolazione della localizzazione di HIPK2.

HIPK2 è considerata una chinasi nucleare localizzata in sub-strutture puntiformi denominate HIPK *bodies*. È stato proposto che un meccanismo con cui le cellule tumorali inattivano la funzione di HIPK2 è la sua delocalizzazione nel citoplasma. Negli esperimenti descritti precedentemente in questa tesi si mostra che EGFP-HIPK2 F.L. murina ha una localizzazione nucleare nel 60% delle cellule ed una localizzazione nucleo/citoplasmatica nel 40%. Esperimenti di Western blot condotti su cellule interferite con i siRNA descritti in precedenza ci hanno permesso di identificare quattro anticorpi specifici per HIPK2. In particolare gli anticorpi n1, n2 e n4 riconoscono HIPK2 F.L. di 130 KDa mentre l'anticorpo n3 riconosce HIPK2 $\Delta e8$ di 128 KDa. Gli anticorpi n1 e n4 riconoscono anche una proteina contenente l'esone 8 ma dal peso molecolare di circa 100KDa compatibile con l'isoforma HIPK2 i13. Esperimenti di Western blot condotti in seguito a frazionamento nucleo/citoplasma in diversi tipi cellulari hanno mostrato che esistono una forma HIPK2 F.L. (HIPK2 F.L. a) e una forma HIPK2 i13, riconosciute dagli anticorpi n1 e n4, con una localizzazione esclusivamente citoplasmatica sia in cellule normali che tumorali; al contrario la forma HIPK2 F.L. (HIPK2 F.L. b) riconosciuta dall'anticorpo n2 ha una localizzazione per lo più nucleare sia in cellule normali che tumorali. L'isoforma HIPK2 $\Delta e8$ riconosciuta dall'anticorpo n3 ha una localizzazione esclusivamente nucleare nelle cellule normali mentre viene parzialmente delocalizzata nel citoplasma nelle cellule tumorali. A questo punto dello studio non possiamo escludere che esistano delle modificazioni post-traduzionali che influenzano l'accessibilità delle proteine agli anticorpi e che, di conseguenza, le tre isoforme siano soggette a diverse modificazioni

post-traduzionali che ne regolano sia il riconoscimento da parte dei diversi anticorpi, sia la localizzazione subcellulare della chinasi.

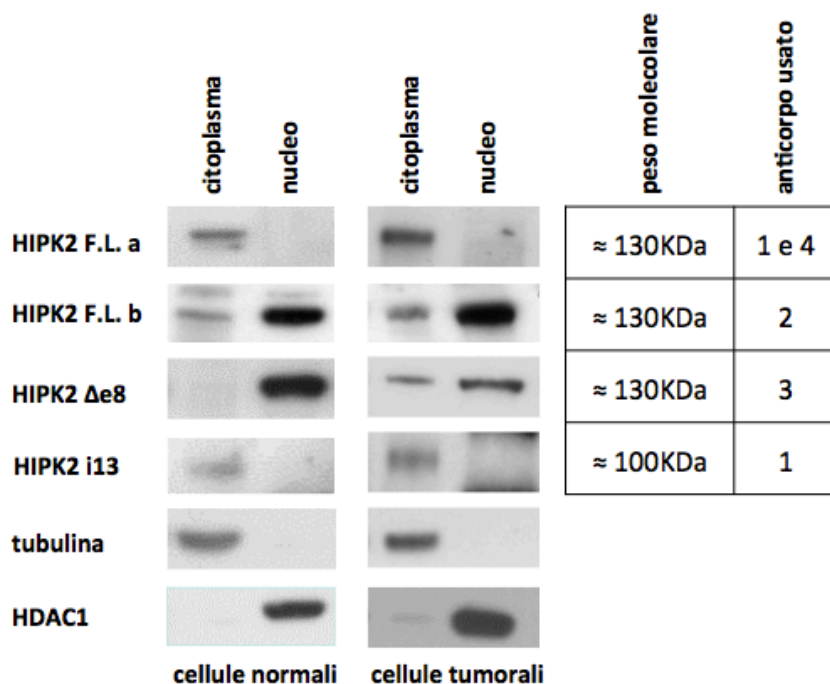


Figura 34. Localizzazione subcellulare di HIPK2. Cellule di osteosarcoma umano U2OS e cellule di carcinoma polmonare H1299 (sono mostrate immagini rappresentative indicate come cellule tumorali) o fibroblasti del tessuto adiposo e linfociti del sangue periferico (sono mostrate immagini rappresentative indicate come cellule normali) sono state sottoposte a frazionamento nucleo/citoplasma e analizzate per Western blot con gli anticorpi α -HIPK2 indicati. Gli anticorpi α -tubulina and α -HDAC1 sono stati utilizzati come marcatori della frazione citoplasmatica e nucleare.

La forma HIPK2 i13 è la più attiva nell'indurre morte cellulare

Per iniziare a studiare l'attività funzionale delle diverse isoforme di HIPK2 abbiamo scelto le sequenze delle tre isoforme sulla base delle analisi *in silico* e chiesta la produzione dei relativi cDNA sintetici. Questi cDNA sono stati singolarmente clonati *in frame* a valle del tag EGFP. I vettori codificanti per le proteine di fusione EGFP-HIPK2 F.L., $\Delta e8$ e i13 sono stati trasfettati transientemente in cellule U2OS, che esprimono la proteina p53 nativa, bersaglio di HIPK2, e la mortalità è stata valutata mediante conte con trypan blue. I risultati indicano che la forma HIPK2 i13 è più attiva della forma F.L. e della $\Delta e8$ nell'indurre morte cellulare. Ciò suggerisce che questa isoforma possa mimare la forma più attiva di HIPK2 risultante dal taglio caspasico e priva del dominio di auto inibizione.

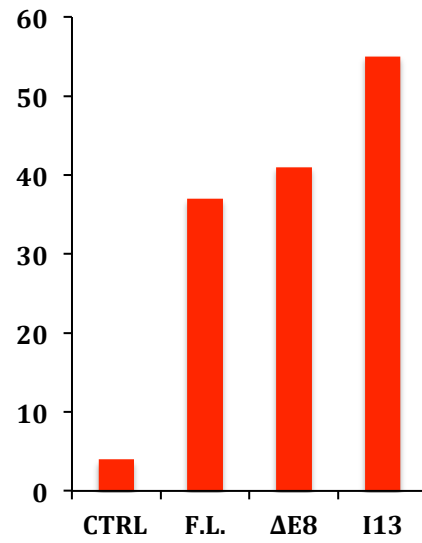


Figura 35. La forma HIPK2 i13 è più attiva nell'indurre morte cellulare. Cellule di osteosarcoma umano U2OS sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione codificanti le proteine indicate. Dopo 24 ore dalla trasfezione la mortalità cellulare è stata valutata contando le cellule positive al colorante Trypan blue.

TABELLE

Tabella I. Fosfo-residui e fosfo-peptidi identificati tramite MS nelle proteine indicate.

	Fosfo-residui #	Fosfo-peptidi	GST-HIPK2	eGST-HIPK2	eGST-K221R	HIPK2(158-557)
1	S9	7-VF _p SPHTLQSSAF-18	P	P	P	
2	S111	111- _p STVSLLDTYQK-121	P	P		
3	S128	126-RK _p SEEIENTSSVQIEEHPPMIQNN-150		P		
4	T134	126-RKSEEIEN _p TSSVQIEEHPPMIQNN-150		P		
5	T245	243-LS _p TESADDYNFVR-255		P		P
6	T266	264-NH _p TCLVFEMLEQNLDFLK-282	P	P		
7	Y354*	349-AVCST _p YLQSR-358	P	P		P
8	S434*	431-DTD _p SPYPLWR-440	P	P		P
9	T475	474-M _p TTDLEGSDMLVEK-487		P		
10	T510	508-RV _p TPIETLNHPFVTMTLLDFPHSAHVK-535		P		P
11	T559	547-RVNMVDTVNQSK _p TPFITH-564	P	P		
12	S628	628- _p SMPLQTGTAQICAR-640		P		
13	S661	641-PDPFQQALIVCPPGFQGLQA _p SPSK-664	P	P	P	
14	T680	672-MENAVPIV _p TQAPGAQPLQIQPGLLAQ-697		P		
15	S808	806-NV _p STCEVTSSQAISPPQR-823		P		
16	S820	806-NVSTCEVTSSQAIS _p SPQR-823	P	P		
17	S840 or S841	835-CAMVH _p S _p SPACSTSVTCGWGDVASSTTR-861	P	P		
18	S927	907-NVISCVTVHDSPPYSDSSNT _p SPYSVQQR-934	P	P	P	
19	S984	967-TQASEVLVECDLGAIP _p SASHSSSFK-993	P	P		
20	S986	967-TQASEVLVECDLGAISA _p SHHSSSFK-993	P	P	P	
21	S1146	1143-VLP _p SPTIHPSQIPAQF-1158	P	P	P	
22	S1179	1174-TGYPL _p SPAKVNQYPYI-1189	P	P	P	

I numeri si riferiscono alla HIPK2 murina (GenBank accession number AF077659).

In grigio chiaro sono indicati isiti di auto-fosforilazione. Gli asterischi indicano i siti di auto-fosforilazione presenti nel dominio chinasi.

Tabella II. Fosfo-residui e fosfo-peptidi identificati tramite MS nelle proteine indicate.

Fosfo-residui [#]	Fosfo-peptidi	eGST-K221R	eGST-HIPK2	eGST-HIPK2 autofosforilata	eGST-Y354F	eGST-Y354F autofosforilata
S9	7-VF _p SPHTLQSSAF-18	P	P	P	P	P
S111	111- _p STVSLLDTYQK-121		P	P		
S128	126-RK _p SEEIENTSSVQIEEHPPMIQNN-150		P	P		
T134	126-RKSEEIEN _p TSSVQIEEHPPMIQN-150		P	P		
T189	189- _p TNTYEVLEFLGR-200					P
T191	189-TN _p TYEVLEFLGR-200					P
T245	243-L _p STESADDYNFVR-255		P	P		
T266	264-NH _p TCLVFEMLEQNLDFLK-282		P	P	P	P
Y354*	349-AVCST _p YLQSR-358		P	P		
S407	405-YI _p SQTQGLPAEYLLSAGTK-423				P	P
T409	405-YISQ _p TQGLPAEYLLSAGTK-423				P	P
S434*	431-DTD _p SPYPLWR-440		P	P	P	P
T475	474-M _p TTDLEGSDMLVEK-487		P	P	P	P
T476	474-MT _p TDLEGSDMLVEK-487				P	P
T510	508-RV _p TPIETLNHPFVTMTLLDFPHSAHVK-535		P	P		
T559	547-RVNMYDTVNQSK _p TPFITH-564		P	P		
S628	628- _p SMPLQTGTAQICAR-640		P	P		
S661	641-PDPFQQALIVCPPGFQGLQA _p SPSK-664	P	P	P	P	P
T680	672-MENAVPIV _p TQAPGAQPLQIQPGLLAQ-697		P	P		
T723	723- _p TSVQHA AVIPETMAGTQQLADWR-745					P
S724	723-T _p SVQHA AVIPETMAGTQQLADWR-745					P
S808	806-NV _p STCEVTSSQAISPPQR-823		P	P		
S820	806-NVSTCEVTSSQAIS _p SPQR-823		P	P	P	P
S840 or S841	835-CAMVH _p S _p SPACSTSVTCGWGDVASSTTR-861		P	P	P	P
S927	907-NVISCVTVDSPYSDSSSNT _p SPYSVQQR-934	P	P	P		P
S984	967-TQASEVLVECDSLGPAI _p SASHHSSSFK-993		P	P		P
S986	967-TQASEVLVECDSLGPAISA _p SHHSSSFK-993	P	P	P		P
S1035	1022-PGPHFQQQQLNL _p SQAQQHHAADR-1045				P	P
S1146	1143-VLP _p SPTIHPSQIPAQF-1158	P	P	P	P	P
S1179	1174-TGYPL _p SPAKVNQYPYI-1189	P	P	P	P	P
Y1186 or Y1188	1174-TGYPLSPAKVNQ _p YP _p YI-1189					P

Numero colonna:

1 2 3 4 5

[#] I numeri si riferiscono alla HIPK2 murina (GenBank accession number AF077659).

In grigio chiaro sono indicati isiti di auto-fosforilazione. Gli asterischi indicano i siti di auto-fosforilazione presenti nel dominio chinasi. In grigio scuro sono indicati i siti fosforilati esclusivamente nel mutante Y354F.

CONCLUSIONI

Il coinvolgimento di HIPK2 in un gran numero di processi biologici differenti solleva la questione dei meccanismi di regolazione nelle diverse vie di segnalazione. Poiché HIPK2 è in grado di autofosforilarsi, abbiamo studiato come e se la fosforilazione ne modificasse la stabilità, l'attività, le interazioni e la localizzazione. L'analisi mediante spettrometria di massa della proteina ricombinante, prodotta in cellule di mammifero, eGST-HIPK2 ha permesso l'identificazione di 22 siti di fosforilazione. È interessante notare che questi siti sono presenti in condizioni basali e sono distribuiti lungo tutti i domini della proteina. La proteina nativa prodotta in batteri conserva solo 14 dei 22 siti di fosforilazione. È possibile che gli 8 siti mancanti siano bersaglio di fosforilazione da parte di altre chinasi eucariotiche o siti che per essere autofosforilati necessitino di diverse modificazioni post traduzionali che non possono essere effettuate nella cellula batterica. Infine, otto di questi 14 siti sono assenti nel mutante cataliticamente inattivo eGST-K221R e possono quindi essere considerati siti di autofosforilazione. Sorprendentemente, tra i siti di autofosforilazione è stata trovata la Y354. Questa tirosina fa parte di una sequenza estremamente conservata nella maggior parte delle chinasi detta *loop* di attivazione. La fosforilazione di uno o due aminoacidi nel *loop* di attivazione è uno dei meccanismi con cui viene regolata l'attività delle chinasi (Johnson and O'Reilly, 1996). Questa fosforilazione può essere catalizzata da chinasi a monte in una via di segnalazione oppure può avvenire mediante autofosforilazione. Al momento, sebbene in HIPK2 siano state trovate tirosine fosforilate in diverse condizioni (Oppermann et al., 2009; Rikova et al., 2007; Walters et al., 2006), non è noto se queste siano fosforilate da altre chinasi o siano il risultato di eventi autocatalitici e se la loro fosforilazione è importante per l'acquisizione dell'attività catalitica. In questo studio abbiamo identificato la Y354 del *loop* di attivazione come un residuo bersaglio di autofosforilazione fondamentale per il conseguimento dell'attività chinasi, della specificità di substrato e della localizzazione cellulare. Sulla base della similarità di sequenza HIPK2 è stata inserita nella sottofamiglia delle chinasi DYRK, caratterizzate dalla capacità di fosforilare i substrati in S e T in seguito alla autofosforilazione della Y del *loop* di attivazione. È stato proposto che, durante la traduzione, un intermedio conformazionale della DYRK nascente si fosforili sulla Y del *loop* di attivazione consentendo la piena attivazione della chinasi. La chinasi matura, rilasciata dal ribosoma, perde la sua capacità di fosforilare tirosine ed acquisisce specificità per S e T. Nelle DYRK, l'inibizione della fosforilazione della Y del *loop* di attivazione, quando possibile, risulta nella perdita della attività tirosina chinasi e in una parziale riduzione della capacità di fosforilare S e T. In HIPK2, come nelle DYRK, la fosforilazione della Y del *loop* di

attivazione è un evento autocatalico. Infatti, le analisi di spettrometria di massa hanno rilevato la presenza della Y354 fosforilata nella proteina ricombinante GST-HIPK2 prodotta sia in cellule umane sia in batteri ma non nel mutante K221R. Inoltre la proteina ricombinante His-HIPK2(158-557), formata dal solo dominio chinamico, è in grado di fosforilarsi sulla Y354 in seguito a defosforilazione. Sempre in analogia con le DYRK, l'attività tirosina chinase di HIPK2 può essere inibita dal PurvalanolA in saggi di tradizione in vitro con reticolociti di coniglio, indicando che è un evento cotraduzionale. Nonostante queste similarità, HIPK2 mostra delle caratteristiche differenti rispetto alle DYRK. In particolare, abbiamo osservato che i) il dominio chinamico defosforilato è in grado di autofosforilarsi in Y354, ii) la HIPK2 matura, sebbene non possa essere defosforilata in modo efficiente, mantiene una certa attività di fosforilazione in tirosina, come dimostrato dall'aumento di reattività con l'anticorpo α -pTyr in seguito a saggi chinasici in vitro iii) il mutante non fosforilabile Y354F, nonostante una ridotta attività sui substrati e su se stessa, acquisisce una forte attività tirosina chinase fuori-bersaglio e si autofosforila su S e T in modo aberrante, iv) l'inibizione della fosforilazione della Y del *loop* di attivazione induce la delocalizzazione della proteina nel citoplasma.

Oltre alla tirosina del *loop* di attivazione, la nostra analisi di spettrometria di massa ha identificato molti altri siti di fosforilazione ed autofosforilazione in S e T la cui funzione è ancora sconosciuta. Sarebbe interessante verificare se altri siti, al di fuori del *loop* di attivazione, possano contribuire alla attivazione della proteina o al riconoscimento del substrato.

In questo lavoro, abbiamo osservato una forte delocalizzazione nel citoplasma in seguito all'inibizione della fosforilazione della Y del *loop* di attivazione. È interessante notare che il mutante K221R, che perde 16 dei 22 siti di fosforilazione, compresa la Y354, conserva una localizzazione prevalentemente nucleare. Analogamente, il doppio mutante K221R/Y354F, che non è fosforilabile sulla Y354 ed è cataliticamente inattivo, non mostra la delocalizzazione nel citoplasma osservata per il singolo mutante Y354F. Ciò suggerisce che la rilocalizzazione citoplasmatica osservata in seguito alla inibizione della fosforilazione del *loop* di attivazione sia dovuta alla aberrante autofosforilazione in Y e S e T piuttosto che ad una generica inibizione della attività chinase. In questo lavoro abbiamo trovato un'aberrante autofosforilazione in S e T solo sulla stessa HIPK2, perciò, al momento attuale, non possiamo escludere che in assenza di fosforilazione sulla Y354, HIPK2 fosforili fuori bersaglio anche i suoi substrati. Con studi ulteriori si potrebbe verificare se questa attività sia legata ad uno stato disfunzionale di HIPK2 che provoca l'inattivazione delle sue funzioni di oncosoppressore come per esempio mutazioni nella Y del *loop* di attivazione o l'iperattivazione di una tirosina fosfatasi o pseudofosfatasi. Alternativamente, è

possibile che quella che fino ad ora abbiamo chiamato ‘attività aberrante’ sia uno stato fisiologico di HIPK2 con cui viene regolata la sua stabilità ed attività.

La presenza di diverse forme a peso molecolare diverso riconosciute dagli anticorpi anti-HIPK2 ha suggerito l’esistenza di isoforme diverse. . In questo lavoro abbiamo mostrato che il gene *HIPK2* umano è soggetto a regolazione mediante *splicing* alternativo e che trascrive, oltre al messaggero *full-length* almeno altre due isoforme differenti. Un’isoforma perde parte dell’esone 8 che codifica per una porzione del dominio di interazione per le proteine omeobox e l’altra isoforma mantiene l’introne 13 che contiene un codone di stop prematuro che causa la mancanza della parte C-terminale della proteina. Gli esperimenti di interferenza specifica dell’RNA hanno mostrato che i livelli di messaggero di ciascuna isoforma sono strettamente dipendenti dai livelli delle altre suggerendo l’esistenza di una regolazione complessa. A questa variabilità si aggiunge un ulteriore livello di complessità dato dalla diversa regolazione mediante modificazioni post-traduzionali. Infatti, i dati ottenuti mediante Western blot su estratti nucleari e citoplasmatici, suggeriscono l’esistenza di almeno due diverse forme di proteine *full-length*, una caratterizzata da un pattern di modificazioni post-traduzionali tale da farla localizzare preferenzialmente nel nucleo ed una esclusivamente nel citoplasma. Inoltre, abbiamo osservato che l’isoforma $\Delta e8$ presenta una localizzazione esclusivamente nucleare nelle cellule primarie non tumorali e che viene parzialmente delocalizzata nel citoplasma in cellule tumorali. Questo comportamento è in accordo con le osservazioni derivanti dall’immunoistochimica di carcinomi alla mammella in cui è evidente una localizzazione citoplasmatica solo nel tessuto tumorale (Pierantoni et al., 2007).

Esperimenti preliminari, condotti iperesprimendo transientemente le proteine di fusione EGFP-HIPK2 F.L., EGFP-HIPK2 $\Delta e8$ e EGFP-HIPK2 i13, suggeriscono che le isoforme di HIPK2 potrebbero avere funzioni differenti, come descritto anche per altri oncosoppressori. In particolare è emerso che la forma i13 è la più attiva nell’induzione di morte cellulare. Questo risultato concorda funzionalmente con i dati presenti in letteratura che dimostrano l’esistenza di una HIPK2 tagliata dalle caspasi in seguito a danno al DNA. Questo taglio caspasico, responsabile dell’eliminazione del dominio di auto-inibizione produce una proteina tronca al C-terminale molto simile alla isoforma i13. Ci sarebbero quindi due diversi meccanismi, il taglio caspasico e lo *splicing* alternativo all’i13, che porterebbero ad una simile funzione biologica: l’induzione di morte cellulare.

Possibili sviluppi futuri: sarebbe interessante assegnare a ciascuna isoforma le sue funzioni specifiche. In particolare, per quanto riguarda le funzioni pro-proliferative di HIPK2, le diverse isoforme saranno espresse in fibroblasti murini *Hipk2*^{-/-} e sarà valutata la capacità di ciascuna proteina di localizzarsi al midbody e di recuperare i difetti di citochinesi. D’altra parte

valuteremo l'attività delle diverse isoforme nella risposta al danno al DNA analizzando, in seguito ad iperespressione, la fosforilazione in S46 di p53 e la degradazione di CtBP e $\Delta Np63\alpha$. È stato dimostrato che nella progressione tumorale c'è una forte de-regolazione dello *splicing* alternativo. Le alterazioni riscontrate nei tumori possono influenzare non solo la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, ma anche l'angiogenesi ed il metabolismo. Come detto in precedenza, nei tumori umani si osserva spesso una de-regolazione dell'espressione di HIPK2 caratterizzata da fenotipi apparentemente divergenti. In tumori alla mammella ed in tumori alla tiroide sono stati trovati bassi livelli di espressione e perdita di eterozigotà al livello del locus genico di *HIPK2* (Lavra et al., 2011; Pierantoni et al., 2002). Al contrario in astrocitomi e tumori alla cervice è stato riscontrato un aumento dei livelli di HIPK2 (Al-Beiti et al., 2008; Deshmukh et al., 2008). Al momento non sono note le basi molecolari di queste divergenze. Sarebbe molto interessante analizzare il pattern di *splicing* alternativo di HIPK2 in diversi tumori e verificare se i dati contraddittori osservati fino ad ora possano essere indicativi di uno sbilanciamento dei livelli delle diverse isoforme.

MATERIALI E METODI

VETTORI DI ESPRESSIONE E TRASFEZIONE

In questo lavoro sono stati utilizzati i seguenti plasmidi: pGEX-HIPK2 (D'Orazi et al., 2002); pEGFPHIPK2, pEGFP-K221R (Rinaldo et al., 2007); pcDNA3GST-HIPK2 and pcDNA3GST-K221R (Cecchinelli et al., 2006). pEGFP-Y354F, pEGFP-Y354A, and pCDNA3GST-Y354F sono stati ottenuti mediante mutagenesi sito specifica effettuata con il kit QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). pcDNA3GST-Y354F(Δ 1050–1189) è stato ottenuto attraverso la digestione con Sall del vettore pcDNA3GST-Y354F per rimuovere gli aminoacidi 1050–1189.

Per ottenere il vettore pcDNA3GST-HIPK2(784–1189), il frammento di DNA che consiste dei nucleotidi 784–1189 del cDNA di Hipk2 murina è stato amplificato mediante PCR dal vettore pBKS-clone#46 (D'Orazi et al., 2002) e clonato nel vettore pCDNA3GST come descritto in precedenza (Cecchinelli et al., 2006).

Per ottenere pGEXHIPK2(158–557), pGEX-K221R(158–557) and pGEX-Y354F(158–557), il frammento di DNA che consiste dei nucleotidi 158–557 è stato amplificato mediante PCR a partire dai vettori pEGFP corrispondenti e clonato nel vettore pGEX6p-2rbs (gentilmente fornito da A. Musacchio) nei siti EcoRI/XhoI. Tutti i costrutti sono stati sequenziati. pEGFP-DYRK1A and pEGFP-Y321F sono stati gentilmente forniti da W. Becker e pEGFP-NF-YA da G. Piaggio.

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

LINEE CELLULARI, CONDIZIONI DI COLTURA, TRATTAMENTI E REAGENTI.

Nel corso degli esperimenti sono state utilizzate cellule umane derivate da carcinoma del colon (RKO), da adenocarcinoma polmonare non a piccole cellule (H1299), da osteosarcoma (U2OS), da leucemia (HEL). I fibroblasti umani utilizzati sono stati immortalizzati con hTERT (Lazari et al., 2011). Le cellule sono mantenute in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con GlutaMAX (Invitrogen) addizionato con 10% di siero bovino fetale inattivato al calore (Invitrogen) e gli antibiotici Pennicillina e Streptomycin (10.000 IU/ml e 10.000 mg/ml, rispettivamente) e incubate a 37° C in presenza di 90% di umidità e 7.0% di CO₂.

La mortalità cellulare è stata valutata contando le cellule positive alla colorazione con il colorante vitale Trypan Blue (Invitrogen).

Dove indicato, le cellule sono state trattate con l'inibitore del proteasoma MG132 (Calbiochem) 2,5 e 5 μ M per 16 ore.

Gli inibitori Purvalanol A e TBB (4,5,6,7-tetrabromo-2-azabenzimidazole) e la proteina basica della mielina sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

Il dominio chinasi di HIPK2 prodotto in cellule di insetto Sf21, His-HIPK2(158–557), è stato acquistato dalla Millipore.

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E 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 nucleo/citoplasma sono stati ottenuti utilizzando il kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) secondo le istruzioni del produttore. Gli estratti solubile ed insolubile sono stati ottenuti come descritto (Garcia-Mata et al., 1999)

Gli estratti proteici sono stati denaturati mediante ebollizione (5 minuti a 95°C), caricati su gel di poliacrilammide gradientato 4-12 % (NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels, Invitrogen) e sottoposti ad elettroforesi in tampone MES (Invitrogen). Le proteine così risolte sono state poi trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa (BIO-RAD) tramite elettroblotting in tampone di trasferimento (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanolo).

Le membrane sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in TBS (Tris-HCl pH 8,0 10mM, NaCl 150mM) contenente il 5% di latte scremato in polvere (BIO-RAD) e 0,05% Tween 20. Successivamente le membrane sono state incubate overnight a 4°C in agitazione con i seguenti anticorpi: l'anticorpo policlonale di coniglio α -HIPK2 (fornito gentilmente dal Dott. M.L. Schmitz); due diversi anticorpi policlonali di coniglio α -HIPK2 prodotti nel nostro laboratorio; un anticorpo monoclonale di ratto α -HIPK2 (fornito gentilmente dal Dott. M.L. Schmitz); l'anticorpo monoclonale di topo α -alfa-tubulina (Immunological Sciences); l'anticorpo monoclonale di topo α -pTyr PY99 (Santa Cruz Biotechnologies); l'anticorpo monoclonale di topo α -pTyr 4G10 (Upstate); l'anticorpo policlonale di coniglio α -HDAC-1 (Sigma-Aldrich).

Successivamente le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario di capra α -IgG di topo, α -IgG di coniglio o α -IgG di ratto 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.

PRODUZIONE E PURIFICAZIONE DI PROTEINE FUSE ALLA GST IN BATTERI

I vettori di espressione sono stati trasformati mediante shock termico in cellule competenti BL21. Una colonia per ogni vettore è stata fatta crescere in 50 ml di brodo LB con ampicillina overnight a 37°C in agitazione. Successivamente la coltura è stata diluita 1:10 in brodo LB con ampicillina ed è stata incubata a 37°C in agitazione fino a che la densità ottica non ha raggiunto il valore di 0,4-0,6. A questo punto è stato aggiunto IPTG (isopropil β -D-1- tiogalattone, Sigma-Aldrich) e le colture sono state incubate in agitazione a 37°C per 3 ore. Le cellule sono state quindi pellettate e lisate nel tampone NETN (20 mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% NP-40) con l'aggiunta di inibitori delle proteasi (Roche), PMSF 1mM e lisozima e successivamente sonicate. Dopo centrifugazione, il supernatante è stato incubato con 25 μ l di resina glutathione-sefariosio (Amersham) per 2 ore a 4°C sulla ruota. Successivamente le proteine sono state eluite dalla resina con il tampone TST (50 mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 0,1% Triton X100) con 5mM DTT, 20 mM glutathione ridotto.

PRODUZIONE E PURIFICAZIONE DI PROTEINE FUSE ALLA GST IN CELLULE UMANE

Le cellule umane H1299 sono state infettate con un virus vaccino ricombinante che veicola la RNA polimerasi del batteriofago T7 (Fuerst et al.,1986). L'infezione è stata effettuata a temperatura ambiente in lenta agitazione e protratta per 1h. Successivamente le cellule sono state trasfettate transientemente come descritto in precedenza (lipofectamine ltx, Invitrogen). 20h dopo l'inizio della trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate 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)]. L'estratto è stato quindi sonicato e chiarificato mediante centrifugazione. Il supernatante è stato quindi sottoposto a GST-pulldown utilizzando la resina glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare). Dopo un'incubazione di 2h in agitazione a +4°C, la resina glutathione-sepharosio con le proteine-GST legate è stata pellettata, lavata 3 volte in tampone di lisi. A seconda dell'utilizzo, le proteine legate alla resina sono state utilizzate in saggi chinasi oppure eluite mediante bollitura in sample buffer e separate mediante SDS-PAGE.

DEFOSFORILAZIONE E TRADUZIONE *IN VITRO*

GST-HIPK2 è stata espressa con il sistema di reticolociti di coniglio (Promega) usando l'RNA polimerasi T7 in una reazione di due ore. Successivamente è stata purificata co resina glutatione sefariosio (GE Healthcare) come descritto sopra. Gli inibitori TBB e PurvalanolA sono stati aggiunti prima dell'inizio della traduzione alle concentrazioni indicate. La defosforilazione è stata effettuata con la λ PPase (New England Biolabs). Dopo il trattamento con λ PPase, la fosfatasi è stata lavata via, sono stati aggiunti gli inibitori delle fosfatasi (Pierce) e sono stati effettuati i saggi chinasici come descritto successivamente.

SAGGI CHINASICI

I complessi ottenuti dal GST- pull down , legati alla proteina G coniugata ad agarosio, sono stati lavati una volta nel tampone chinasico (20mM Hepes, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂,) dopo una breve centrifugazione (10 secondi a 13000 rpm) la resina è stata portata a secco e risospesa in 25 μ l finali di soluzione per la reazione chinasica (20mM Hepes, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 5 μ Ci [γ -³²P]ATP). La reazione è stata effettuata a 30°C per 30 minuti successivamente bloccata risospesa in un ugual volume di loading buffer (Invitrogen) in condizioni riducenti.

IMMUNOFLUORESCENZA

Sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza indiretta utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti-calreticulina (Affinity BioReagents, policlonale da coniglio), anti GM130 (BD Biosciences, monoclonale da topo), anti- γ tubulina (Sigma, policlonale da coniglio), anti- ubiquitina (Santa Cruz, monoclonale da topo).

Le cellule sono state fissate usando formaldeide al 2% in PBS (anti-calreticulina, anti-GM130 e anti-ubiquitina) o formaldeide al 4% in PBS seguita da metanolo (anti- γ tubulina) , permeabilizzate con PBS contenente 0,25 % Triton e successivamente incubate 30 minuti con una soluzione di BSA al 3% in PBS per saturare i siti di legame aspecifici. Le cellule sono state poi incubate con gli anticorpi primari, diluiti in PBS con 3% BSA, per un ora a temperatura ambiente (anti-calreticulina, anti-GM130 e anti-ubiquitina) o a 37° C (anti- γ tubulina). È stata poi effettuata l'incubazione con gli anticorpi secondari anti-IgG di coniglio (anti-calreticulina, anti- γ tubulina) o anti-IgG topo (anti GM130 e anti ubiquitina) coniugati a rodamina (Jackson).

Per la visualizzazione dell'autofluorescenza dell' EGFP le cellule sono state fissate usando formaldeide al 2% in PBS e permeabilizzate con PBS contenente 0,25 % Triton.

Per la colorazione specifica dei mitocondri è stato utilizzato il reagente MitoTracker Red (Invitrogen) che è stato aggiunto al terreno di coltura (100nM) per 45 minuti prima del fissaggio in formaldeide. In tutti gli esperimenti il DNA è stato evidenziato mediante colorazione con Hoechst. Tutti i preparati sono stati poi osservati con un microscopio a fluorescenza dotato di lampada al mercurio 100W .

ESTRAZIONE DELL'RNA, RETROTRASCRIZIONE, RT-PCR E REAL-TIME PCR

L'RNA è stato estratto utilizzando il kit RNeasy Mini (Quiagen) secondo le istruzioni del produttore e retrotrascritto utilizzando il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La reazione di retrotrascrizione è stata condotta utilizzando i reagenti forniti dal kit incubando la mix di reazione 10 minuti a 25°C per attivare l'enzima seguiti da due ore a 37°C. Le reazioni di PCR semiquantitativa sono state condotte utilizzando la GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e i seguenti primers:

HIPK2 e6 5'- GGCTGACCGGCGGGAGTT- 3'

HIPK2 e8 5'- GGTCAGGCCGCGGCACAAATCT- 3'

HIPK2 e11 5'- AGCAGCCAACCAGCACCACCT- 3'

HIPK2 i13 5'- GCCTGCAGTCACTGGGCACTT- 3'

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'- TGCTGATGGTGTGACACTGA- 3'

GAPDH UPPER: 5'- TCCCTGAGCTGAACGGGAAAG- 3'

GAPDH LOWER: 5' – GGAGGAGTGGGTGTCTGCTGT- 3'

INTERFERENZA DELL'RNA

Per l'interferenza transitoria dell'RNA di HIPK2 sono stati utilizzati i seguenti siRNA(MWG)

HIPK2 Δe8 #1 5'-UGUCCACAACCAGCCCUCA-3'

#2 5'-ACUGUCCACAACCAGCCCU-3'

HIPK2 i13 #1 5'-CUUUUCUGCUGCUAGAAAU-3'

#2 5'-GUGGUUUUCCUGCUUUUCU-3'

I siRNA sono stati trasfettati transientemente utilizzando il sistema basato su liposomi Lipofectamine® RNAiMAX e incubati per 120 ore.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA SPETTROMETRIA DI MASSA

In seguito alla purificazione, i campioni sono stati eluiti dalla resina mediante un'incubazione di 10' a 70°C in sample buffer riducente (Invitrogen). Successivamente sono stati separati mediante SDS-PAGE utilizzando gel gradientati 4-12 % (NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels, Invitrogen). La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone MES (Invitrogen). Le proteine sono state quindi colorate utilizzando Comassie colloidale (Invitrogen) e dopo decolorazione, le bande corrispondenti alle proteine di interesse excise dal gel e trattate per l'analisi di massa (effettuata dalla Dott.ssa Serena Camerini dell'Istituto Superiore di Sanità).

BIBLIOGRAFIA

Al-Beiti MA, Lu X. Expression of HIPK2 in cervical cancer: correlation with clinicopathology and prognosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 48(3):329-36. (2008).

Arai, S., Matsushita, A., Du, K., Yagi, K., Okazaki, Y. & Kurokawa, R. Novel homeodomain-interacting protein kinase family member, HIPK4, phosphorylates human p53 at serine 9. *FEBS Lett.* 581:5649-5657 (2007).

Aranda S, Laguna A, de la Luna S. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* 25(2):449-62 (2011)

Beaudoin S, Goggin K, Bissonnette C, Grenier C & Roucou X Aggresomes do not represent a general cellular response to protein misfolding in mammalian cells. *BMC Cell Biol* 9:59 (2008)

Brundin P, Melki R & Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:301-7 (2010)

Calzado, M.A., Renner, F., Roscic, A., & Schmitz, M.L. 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(11):1994-7 (2006)

Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(11):741-54 (2009)

Choi, C.Y., Kim, Y.H., Kwon, H.Y. & Kim, Y. The Homeodomain Protein NK-3 Recruits Groucho and a Histone Deacetylase Complex to Repress Transcription. *J Biol Chem.* 274:33194-33197 (1999).

Dauth, I., Kruger, J., Hofmann, T.G. 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).

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 pilocytic astrocytomas. *Oncogene.* Aug 27(34):4745-51 (2008)

Diskin, R., Lebendiker, M., Engelberg, D. & Livnah, O. Structures of p38 α active mutants reveal conformational changes in L16 loop that induce autophosphorylation and activation. *J Mol Biol.* 365:66-75 (2007).

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.* 293:311-20 (2004).

D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno T., Mann, I., Higashimoto, Y., et al. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 4:11-19 (2002).

Garcia-Mata R, Gao YS & Sztul E. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic.* 3:388-96 (2002)

Gresko, E., Moller, A., Roscic, A. & Schmitz, M.L. Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:1293–1299 (2005).

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

Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, Roscic A, Fröbuis 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(5):698-708 (2009).

Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. & Ulevitch, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265:808-811 (1994).

Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science*, 241:42-52 (1988).

Harada, J., Kokura, K., Kanei-Ishii, C., Nomura, T. et al. Requirement of the co-repressor homeodomain-interacting protein kinase 2 for ski-mediated inhibition of bone morphogenetic protein-induced transcriptional activation. *J Biol Chem.* 278:38998-9005 (2003).

Hattangadi SM, Burke KA, Lodish HF. Homeodomain-interacting protein kinase 2 plays an important role in normal terminal erythroid differentiation. *Blood* 115(23):4853-61(2010)

Himpel S, Panzer P, Eirmbter K, Czajkowska H, Sayed M, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grötzinger J, Joost HG & Becker W. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A *Biochem J.* 359:497-505.

Hofmann, T.G., Mincheva, A., Lichter, P., Dröge, W. & Schmitz, M.L. 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, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M.L. 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.* 1;63(23):8271-7(2003).

Hofmann, T.G., Jaffray, E., Stollberg, N., Hay, R.T. & 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).

Iacovelli S, Ciuffini L, Lazzari C, Bracaglia G, Rinaldo C, Prodosmo A, Bartolazzi A, Sacchi A, Soddu S. HIPK2 is involved in cell proliferation and its suppression promotes growth arrest independently of DNA damage. *Cell Prolif.* 42(3):373-84 (2009).

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(7):2758-71 (2006).

Jin Y, Ratnam K, Chuang PY, Fan Y, Zhong Y, Dai Y, Mazloom AR, Chen EY, D'Agati V, Xiong H, Ross MJ, Chen N, Ma'ayan A, He JC. A systems approach identifies HIPK2 as a key regulator of kidney fibrosis. *Nat Med.* 18(4):580-8 (2012)

Johnson L.N., O'Reilly M., Control by phosphorylation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 762–769. (1996)

Kaida D1, Schneider-Poetsch T, Yoshida M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression. *Cancer Sci.* 103(9):1611-6 (2012)

Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H. & Joost, H.G. Dyrk, a Dual Specificity Protein Kinase with Unique Structural Features Whose Activity Is Dependent on Tyrosine Residues between Subdomains VII and VIII. *J. Biol. Chem.* 271:3488-3495 (1996).

Kim, Y. H., Choi, C. Y., Lee, S. J., Conti, M. A., & Kim, Y. Homeodomain- interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273:25875-25879 (1998).

Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. 10:524-30(2000)

Kumar, S., McLaughkin, M.M., McDonnel, P.C., Lee, J.C., Livi, G.P. & Young, P.R. Human Mitogen-activated Protein Kinase CSBP1, but Not CSBP2, Complements a *hog1* Deletion in Yeast J. Biol. Chem. 270:29043-29046 (1995).

Lavin, M.F. & Gueven, N. The complexity of p53 stabilization and activation. Cell Death Differ. 13:941-50 (2006).

Lavra L, Rinaldo C, Ulivieri A, Luciani E, Fidanza P, Giacomelli L, Bellotti C, Ricci A, Trovato M, Soddu S, Bartolazzi A, Sciacchitano S. The loss of the p53 activator HIPK2 is responsible for galectin-3 overexpression in well differentiated thyroid carcinomas. PLoS One. 6(6):e20665 (2011).

Lazzari C, Prodosmo A, Siepi F, Rinaldo C, Galli F, Gentileschi M, Bartolazzi A, Costanzo A, Sacchi A, Guerrini L, Soddu S. HIPK2 phosphorylates Δ Np63 α and promotes its degradation in response to DNA damage. Oncogene. 30(48):4802-13 (2011).

Li Q, Lin S, Wang X, Lian G, Lu Z, Guo H, Ruan K, Wang Y, Ye Z, Han J & Lin SC. Axin determines cell fate by controlling the p53 activation threshold after DNA damage. Nat Cell Biol. 11:1128-34 (2009)

Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N & Cleghon V. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs Cell 121:925-36 (2005)

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

Mayo, L.D., Seo, Y.R., Jackson, M.W., Smith, M.L., Rivera Guzman, J., Korgaonkar, C.K. & Donner, D.B. Phosphorylation of human p53 at Ser46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. J. Biol. Chem. 280:25953-59 (2005).

Mao JH, Wu D, Kim IJ, Kang HC, Wei G, Climent J, Kumar A, Pelorosso FG, DelRosario R, Huang EJ, Balmain A. Hipk2 cooperates with p53 to suppress γ -ray radiation-induced mouse thymic

lymphoma. *Oncogene*. 31(9):1176-80 (2012).

Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(5):386-98 (2005)

Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T.G., Rueffer, S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., & Schmitz, M.L. 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 (2003).

Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W. & Weinert T.A. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*. 36:617-656 (2002).

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

Oppermann F.S., Gnad F., Olsen J.V., Hornberger R., Greff Z., Keri G., Mann M., Daub H. Large-scale proteomics analysis of the human kinome, *Mol. Cell Proteomics* 8:1751–1764. (2009)

Pal S, Gupta R, Davuluri RV. Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacol Ther*. 136(3):283-94 (2012)

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

Rikova K1, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzel R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J, Comb MJ. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 131(6):1190-203 (2007)

Pierantoni GM, Rinaldo C, Mottolese M, Di Benedetto A, Esposito F, Soddu S, Fusco A. High-mobility group A1 inhibits p53 by cytoplasmic relocalization of its proapoptotic activator HIPK2. *J Clin Invest.* 117(3):693-702 (2007).

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.* 25;290(3):942-7 (2002).

Puca R, Nardinocchi L, Givol D, D'Orazi G. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene.* 29(31):4378-87 (2010).

Ricci A, Cherubini E, Ulivieri A, Lavra L, Sciacchitano S, Scozzi D, Mancini R, Ciliberto G, Bartolazzi A, Bruno P, Graziano P, Mariotta S. Homeodomain-interacting protein kinase2 in human idiopathic pulmonary fibrosis. *J Cell Physiol.* 228(1):235-41 (2013)

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. *Molecular Cell*, 25:739-750 (2007) [a].

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

Rinaldo C, Moncada A, Gradi A, Ciuffini L, D'Eliseo D, Siepi F, Prodosmo A, Giorgi A, Pierantoni GM, Trapasso F, Guarguaglini G, Bartolazzi A, Cundari E, Schininà ME, Fusco A, Soddu S. HIPK2 controls cytokinesis and prevents tetraploidization by phosphorylating histone H2B at the midbody. *Mol Cell.* 47(1):87-98 (2012).

Roscic, A., Moller, A., Calzado, M.A., Renner, F., Wimmer, V.C., Gresko, E., Schmid Ludi, K., & Schmitz M.L. Phosphorylation-Dependent Control of Pc2 SUMO E3 Ligase Activity by Its Substrate Protein HIPK2. *Molecular Cell*, 24:77–89 (2006).

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

Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Baranov, E., Hofmann, R.M. & Lowe, S.W. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1:289-298(2002)

Trapasso F, Aqeilan RI, Iuliano R, Visone R, Gaudio E, Ciuffini L, Alder H, Paduano F, Pierantoni GM, Soddu S, Croce CM, Fusco A. Targeted disruption of the murine homeodomain-interacting protein kinase-2 causes growth deficiency in vivo and cell cycle arrest in vitro. *DNA Cell Biol.* 28(4):161-7 (2009).

Vousden, K.H. p53: death star. *Cell*, 103:691-694 (2000).

Wang, Z., Harkins, P.C., Ulevitch, R.J., Han, J., Cobb, M.H. & Goldsmith, E.J. The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:2327-2332 (1997)

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(9):3777-87 (2008)

Walters DK, Goss VL, Stoffregen EP, Gu TL, Lee K, Nardone J, McGreevey L, Heinrich MC, Deininger MW, Polakiewicz R, Druker BJ. Phosphoproteomic analysis of AML cell lines identifies leukemic oncogenes. *Leuk Res*. 30(9):1097-104 (2006)

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(46):34810-5 (2006)

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(32):13040-5 (2007)

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(2):257-67 (2004).

Wilson, K.P., Fitzgibbon, M., Caron, P.R., Griffith, J.P., Chen, W., McCaffrey, P.G., Chamber, P.S. & Su, M.S. Crystal Structure of p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* 271:27696-27600 (1996).

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.* 10:812-24 (2008)

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(2):177-86 (2003)