

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"La Sapienza"**



**Dottorato di Ricerca in Endocrinologia e Medicina
Molecolare**

TESI DI DOTTORATO

**"BASI MOLECOLARI DEL MEDULLOBLASTOMA:
RUOLO DELLE E3-LIGASI REN ED ITCH NEL
SIGNALING DI HEDGEHOG"**

Dottoranda: Laura Pietrosanti

Relatore:

Prof. Alberto Gulino

Correlatore:

Prof.ssa Lucia Di Marcotullio

INDICE

INDICE.....	2
1. RIASSUNTO.....	4
2. INTRODUZIONE	7
2.1 Il medulloblastoma e lo sviluppo del cervelletto.....	7
2.2 La via di traduzione del segnale di Hedgehog nello sviluppo del cervelletto.....	9
2.3 Ruolo della pathway di Hedgehog nella tumorigenesi del medulloblastoma	12
2.4 Il processo di ubiquitinazione	15
2.5 L'ubiquitinazione come meccanismo di controllo della pathway di Hedgehog.....	18
2.6 ITCH.....	20
2.7 NUMB.....	23
2.8 Il medulloblastoma e la delezione del cromosoma 17p	25
2.9 Il gene oncosoppressore REN ^{KCTD11}	26
2.10 REN ^{KCTD11} come antagonista di Hedgehog.....	27
3. RISULTATI.....	29
PRIMA PARTE	
Numb promuove l'attività di Itch nel controllare la funzione di Gli1 attraverso un nuovo segnale di degradazione.	
3.1 Numb promuove l'attività catalitica di ITCH.....	29
3.2 Gli 1 interagisce direttamente con Itch attraverso due distinti motivi PPXY e motivi fosfo-serina/prolina.....	31
3.3 Il degrone PPXYs/p SP è richiesto per l'ubiquitinazione di Gli1 da parte di Itch.....	33
3.4 Itch diminuisce l'attività trascrizionale di Gli1 promuovendo la sua degradazione.....	34
3.5 Numb recluta Gli1 in un complesso ternario con Itch.....	35
3.6 Il degrone PPXYs/pSP di Gli1 è richiesto per la regolazione della sua ubiquitinazione da parte di Numb.....	36
3.7 Il degrone PPXYs/pSP di Gli1 è richiesto per il controllo delle sue proprietà oncogeniche.....	36
4. DISCUSSIONE.....	39

5. RISULTATI.....	42
SECONDA PARTE	
Ruolo di Ren^{KCTD11}, una nuova E3-ligasi come antagonista della pathway di Hedgehog.	
5.1 REN è una nuova Cul3 E3 Ubiquitina-Ligasi	42
5.2 REN/Cul3 E3-ligasi lega, ubiquitina e degrada HDAC1.....	44
5.3 REN regola negativamente l'attività di HDAC1	47
5.4 L'espressione di HDAC1 è correlata all'attivazione della pathway di Hh nello sviluppo del cervelletto.....	48
5.5 HDAC1 è up-regolato nel medulloblastoma ed è richiesto per la regolazione Hh dipendente della crescita delle cellule.....	49
6.DISCUSSIONE.....	51
7. MATERIALI E METODI	53
7.1 Anticorpi e plasmidi.....	53
7.2 Colture primarie	53
7.3 Colture cellulari e trasfezioni.....	54
7.4 Immunoprecipitazione	54
7.5 Immunoistochimica.....	55
7.6 Estrazione di RNA da colture cellulari e RT-PCR	56
7.7 Ubiquitinazione in vitro	56
7.8 Saggio di GST pull-down.....	56
7.9 Saggi di proliferazione cellulare, formazione di colonie, formazione di foci, migrazione e invasione.....	57
7.10 Analisi statistica.....	58
8.BIBLIOGRAFIA	59

1. RIASSUNTO

Il medulloblastoma è la forma più comune di neoplasia infantile. È causato da alterazioni genetiche e epigenetiche che influenzano lo sviluppo delle cellule progenitrici dei granuli del cervelletto. Tali difetti comprendono delezioni cromosomiali, come la delezione del braccio corto del cromosoma 17, ed alterazioni nelle più importanti vie di trasduzione del segnale. È stato recentemente descritto che il medulloblastoma è strettamente legato all'attivazione costitutiva della pathway Sonic-Hedgehog-Gli. Sebbene il ruolo del segnale di Hedgehog (Hh) nei processi di embriogenesi e tumorigenesi sia ben noto, i meccanismi molecolari che ne sottendono la regolazione sono ancora ad oggi non definiti. Dati di letteratura riportano che processi proteolitici ubiquitina-dipendente rappresentano un evento cruciale per il controllo della via di Hh.

Nel nostro laboratorio sono stati identificati due nuovi meccanismi di degradazione ubiquitina-dipendente coinvolti nella regolazione della proteina Gli1, il principale effettore del signaling di Hh: i) un meccanismo di degradazione promosso dalla proteina "adaptor" Numb e mediato dalla E3-ligasi Itch, appartenente alla famiglia delle HECT-E3 ubiquitin ligasi; ii) un meccanismo di degradazione indotto da una nuova E3-ligasi, REN/Cul3, da noi identificata, appartenente alla famiglia delle RING E3-ligasi.

Dati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo avevano dimostrato che una riduzione dei livelli di ubiquitinazione di Gli1, con conseguente accumulo, avvengono nel medulloblastoma a causa della perdita di Numb, una proteina coinvolta nella determinazione del destino cellulare, nel self-renewal e nel differenziamento (Di Marcotullio et al., 2006; Gulino et al., 2010). Inoltre era stato dimostrato come l'ubiquitinazione e la degradazione di Gli1 indotta da Numb fosse mediata dall'E3 ligasi Itch (Di Marcotullio et al., 2006). Sebbene, il ruolo dell'asse Gli/Numb/Itch nello sviluppo del medulloblastoma fosse stato ben sviluppato, i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dell'attività di queste proteine non erano stati chiariti.

Nella prima parte del mio lavoro di tesi ci siamo occupati di approfondire i meccanismi alla base dell'interazione tra Numb, Itch e Gli1 e di evidenziarne il significato funzionale.

Numb interagisce con la regione centrale di Itch, contenente i domini WW, in particolare con il secondo dominio WW (WW2). Domini WW sono comunemente utilizzati per il legame con i diversi substrati di Itch, ed infatti abbiamo anche scoperto che Gli1 interagisce con la medesima regione. Tramite esperimenti di legame, sia *in vivo* che *in vitro*, abbiamo dimostrato che Numb ha la funzione sia di attivare Itch che di reclutare Gli1.

Itch si trova infatti in una conformazione inattiva auto-inibitoria, in cui il ripiegamento del dominio catalitico HECT (C-terminale) in corrispondenza della regione dei WW (N-terminale), ne inibisce la sua attività catalitica. Il legame di Numb destabilizza l'interazione HECT-WW promuovendo l'apertura della struttura e portando quindi ad una conformazione attiva. Ciò favorisce l'entrata di Gli1 nel complesso e la sua successiva ubiquitinazione. A tal proposito, abbiamo dimostrato che Itch è in grado di legare direttamente Gli1 e che tale legame avviene tra i domini WW di Itch e i WW-binding sites PPXY e la S¹⁰⁶⁰P, presenti nella regione C-terminale di Gli1. Importante, la proteina Gli1 mutata in questi siti non è soggetta alla proteolisi indotta da Itch e presenta maggiori proprietà oncogeniche.

La seconda parte del lavoro di tesi è stata finalizzata all'analisi dei meccanismi molecolari che regolano l'attività di REN^{KCTD11}/Cul3 ed alla loro alterazione nel medulloblastoma.

In un lavoro precedentemente pubblicato, avevamo identificato REN^{KCTD11} come un oncosoppressore, localizzato sul cromosoma 17p e capace di antagonizzare l'attività di Hh. Sebbene fosse stata dimostrata la capacità di REN^{KCTD11} di inibire la funzione trascrizionale di Gli1, i meccanismi responsabili di questo processo non erano stati chiariti.

Il fatto che REN possiede un dominio BTB/POZ (coinvolto nell'interazione con la Cullina3), responsabile del suo effetto sulla crescita e differenziamento dei progenitori neuronali e che uno dei meccanismi di ubiquitinazione di Gli1, vede il coinvolgimento del complesso HIB-SPOP/Cul3, ci ha fatto ipotizzare che REN^{KCTD11} fosse in grado di interagire con Cul3 e regolare la stabilità di proteine del signaling di Hh. Tramite esperimenti di co-IP e saggi di ubiquitinazione *in vitro* ed *in vivo*, abbiamo mostrato che REN^{KCTD11}, attraverso un legame diretto con il dominio BTB/POZ, forma un complesso con Cul3 e svolge azione ubiquitin-ligasica. In particolare, abbiamo dimostrato che REN^{KCTD11} è capace di indurre ubiquitinazione

e degradazione di HDAC1, una deacetilasi recentemente identificata nel nostro laboratorio come un potente attivatore del signaling di Hh e altamente espressa nei medulloblastomi. L'espressione ectopica di REN^{KCTD11}, in linee cellulari di medulloblastoma, determinava una riduzione dei livelli di HDAC1, portando ad inibizione dell'attività di Gli1 e ad arresto della proliferazione.

I risultati ottenuti da questa ricerca svelano la funzione di REN^{KCTD11} come una nuova Cul3-E3 ligasi ed il meccanismo attraverso il quale REN^{KCTD11}, regolando negativamente HDAC1, inibisce il signaling di Hh.

Queste evidenze sperimentali identificano nuovi meccanismi di regolazione dell'attività di Gli1 e forniscono una solida ragione per indagare sull'ipotesi che le proteine, Numb, Itch e REN^{KCTD11}, sono coinvolte nello sviluppo del medulloblastoma e possono rappresentare bersagli per nuove strategie terapeutiche.

2. INTRODUZIONE

2.1 Il Medulloblastoma e lo sviluppo del cervelletto

Il medulloblastoma è uno dei tumori cerebrali maligni più frequenti nell'infanzia, rappresentando il 15-20% di tutte le neoplasie infantili primitive del sistema nervoso centrale. Si origina dal cervelletto ed è associato a meccanismi alterati durante un normale sviluppo. I tumori pediatrici, diversamente da quelli adulti, hanno un periodo di latenza più breve e mostrano alterazioni genetiche causate dall'attivazione di un oncogene o dall'inattivazione di un regolatore pro-apoptotico. Una ragione per queste differenze deriva dal fatto che il tumore si origina da cellule staminali o da cellule progenitrici che possiedono già una capacità proliferativa. Le cellule del medulloblastoma presentano caratteristiche inconfondibili tipiche delle cellule progenitrici del cervello embrionale: sono piccole, tondeggianti, con scarso citoplasma, nucleo tondeggianti intensamente ematossinofilo per l'abbondante cromatina grossolanamente distribuita, indifferenziate ed esprimono proteine specifiche dei neuroni e della glia.

Le cellule neoplastiche si trovano frequentemente vicino la superficie del cervelletto. Queste proprietà non appartengono completamente alle cellule cerebrali, ma sono simili a quelle dei precursori delle cellule nervose del cervelletto, chiamate GCPs (granuli cells precursors). Per questa ragione molti studiosi sostengono che il medulloblastoma origini dalle GCPs trasformate, le quali sottoposte a alterazioni genetiche e epigenetiche, perdono i segnali che ne inducono il normale differenziamento andando incontro a una crescita incontrollata.

Il medulloblastoma costituisce una forma tumorale altamente eterogenea che presenta numerose variazioni morfologiche e istologiche. In base alle caratteristiche istologiche, infatti, il medulloblastoma viene classificato come:

- Classico, caratterizzato da cellule piccole e rotondeggianti con scarso citoplasma (80% dei casi). In alcuni casi possono trovarsi strutture a rosetta simili a quelle del neuroblastoma.
- A larghe cellule, aventi nucleo vescicoloso e nucleoli voluminosi (2-4% dei casi).

- Medullomioblastoma, nel cui contesto sono presenti cellule muscolari striate e lisce.
- Melanocitico, con cellule piccole, indifferenziate contenenti melanina.

Nel complesso queste varianti costituiscono le forme "non desmoplastiche" che si distinguono dalla forma "desmoplastica", più frequente negli adulti e spesso con localizzazione cerebellare emisferica. Tale forma è caratterizzata dalla presenza di zone nodulari con scarsa popolazione cellulare e fine matrice fibrillare, circondate da cellule proliferanti densamente stipate con nuclei ipercromici che producono una densa rete di fibre reticoliniche (Dhall, 2009).

Il cervelletto è un organo caratterizzato da un processo di sviluppo lento e delicato, che inizia durante la vita embrionale e termina, almeno nell'uomo, durante i primi due anni di vita post-natale. A richiedere una sua così lunga gestazione è soprattutto l'organizzazione della corteccia, la lamina di sostanza grigia in cui è concentrata la maggior parte delle cellule nervose che lo costituiscono. Essa è formata, a sviluppo completato, da tre strati contenenti diverse popolazioni cellulari: lo strato esterno o strato molecolare, povero di cellule e ricco di terminazioni nervose contenente le cellule a canestro, stellate e fusiformi; lo strato intermedio costituito dai corpi cellulari delle cellule del Purkinje e lo strato più interno o dei granuli, costituito da piccolissime cellule sferiche con brevi dendriti (**Fig.1**). Quest'ultima è la popolazione cellulare più rappresentata. I loro precursori, le GCPs, derivano dall'epitelio germinale del cosiddetto "rhombic lip", la regione del romboencefalo posta all'interfaccia tra il tubo neurale e il tetto del IV ventricolo. Da qui, intorno all'undicesima settimana gestazionale, le GCPs migrano tangenzialmente e vanno a ricoprire la superficie esterna del cervelletto costituendo lo strato germinativo esterno, chiamato EGL (External Granule Layer). Le cellule contenute nell'EGL sono caratterizzate da una intensa attività proliferativa, ma progressivamente esse intraprendono un programma differenziativo che le porterà alla formazione di granuli maturi. Il processo di differenziamento di queste cellule inizia con l'uscita dal ciclo cellulare e prosegue con la loro migrazione in profondità, attraverso lo strato delle cellule del Purkinje che le porterà a raggiungere la localizzazione definitiva nello strato interno chiamato IGL (Internal Granule Layer) (Hatten and Heiz, 1995; Altman and Bayer, 1997; Wang and Zoghbi, 2001) (**Fig.2**). Di conseguenza, l'EGL va incontro,

FIG.1

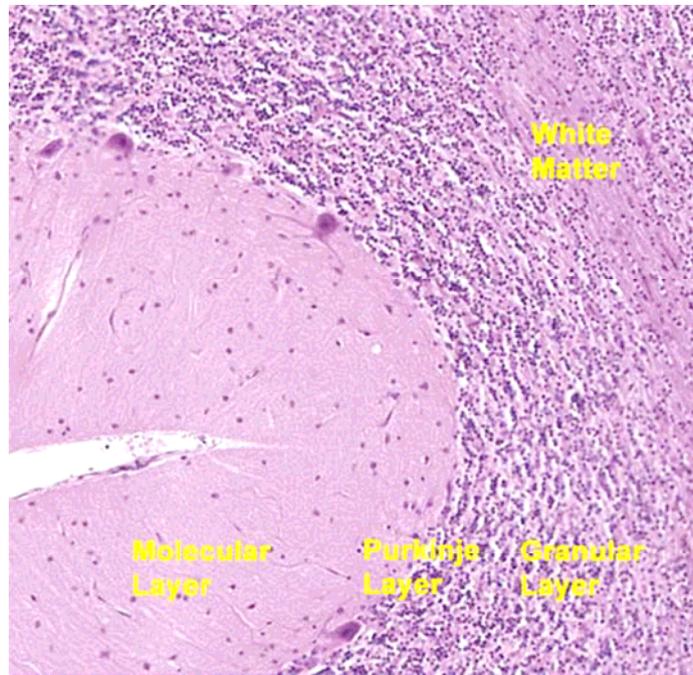


Fig.1: Organizzazione della corteccia del cervelletto.

La corteccia del cervelletto è formata, a sviluppo completato, da 3 strati contenenti diverse popolazioni cellulari: lo strato esterno o molecolare, povero in cellule e ricco di terminazioni nervose; lo strato intermedio, costituito da corpi cellulari delle cellule del Purkinje; lo strato più interno o dei granuli, costituito da piccolissime cellule sferiche con brevi dendriti.

FIG.2

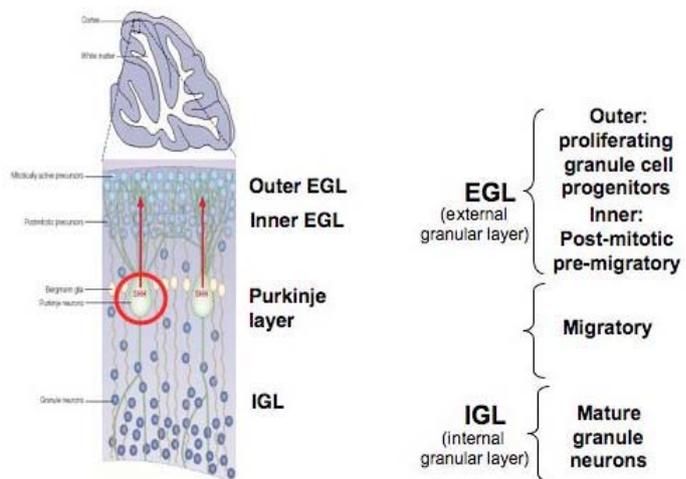
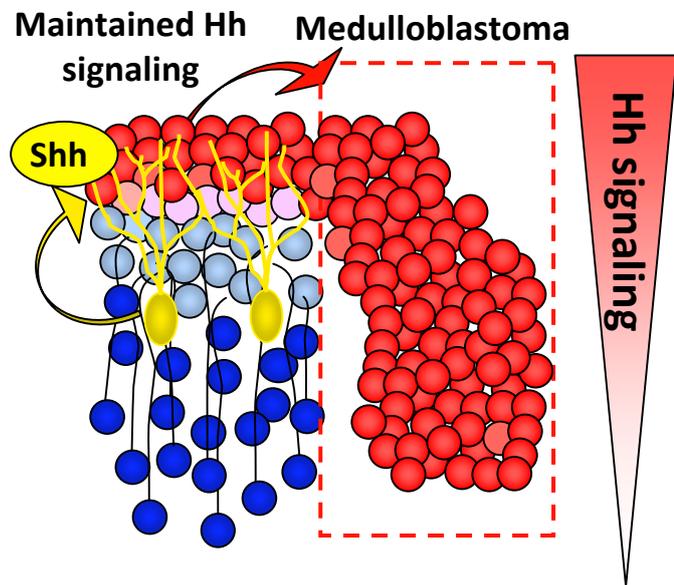


Fig.2: lo sviluppo del cervelletto: rappresentazione schematica della migrazione dei granuli attraverso i vari compartimenti cellulari e l'effetto mitogeno di Shh.

inizialmente ad una rapida espansione che ha il suo culmine nei primi mesi di vita post-natale, e successivamente, a causa dei fenomeni differenziativi inizia ad assottigliarsi, fino a scomparire nel primo anno di vita (Lemire et al.,1975). Il programma di sviluppo a cui le GCPs vanno incontro, fino all'acquisizione delle caratteristiche fenotipiche dei granuli maturi, è caratterizzato dal succedersi di fasi proliferative, migratorie e differenziative. La sua complessità richiede una fine regolazione e l'attivazione sequenziale di diverse pathway. Tra queste una delle più importanti è proprio la pathway di Hedgehog. In letteratura è stata descritta la rilevanza di questa via trasduzionale sia per il rinnovamento che per l'auto-mantenimento delle cellule staminali neuronali. Diversi studi hanno inoltre dimostrato come proprio la sua attivazione sia correlata all'intensa attività mitotica delle GCPs presenti nell'EGL.

2.2 La via di trasduzione del segnale di Hedgehog nello sviluppo del cervelletto

La via di trasduzione del segnale di Hedgehog (Hh) è una pathway conservata nel corso dell'evoluzione, dalla *Drosophila* all'uomo, nota giocare un ruolo critico nei processi di sviluppo, embriogenesi e tumorigenesi.

La famiglia Hh è composta da tre membri : Desert (Dhh), Indian (Ihh) e Sonic hedgehog (Shh), ciascuno dei quali risulta essere coinvolto in diversi aspetti dello sviluppo tissutale. Ihh partecipa al differenziamento dell'endoderma e del tessuto osseo, Dhh nella spermatogenesi e Shh in molti aspetti dello sviluppo neurale (Wechsler-Reya and Scott 2001; Ruiz i Altaba, Palma et al. 2002).

La trasduzione del segnale di Hh avviene in seguito all'interazione con il suo recettore specifico, Patched (Ptch), una proteina che presenta dodici motivi transmembrana. Questo legame interrompe l'azione inibitoria dello stesso Ptch sul co-recettore Smoothed (Smo), una proteina a sette motivi transmembrana. Questa azione consente al complesso citoplasmatico formato dalle proteine Suppressor of Fused (SUFU), Fused (Fu) e Costal-2 (Cos-2), di rilasciare i fattori trascrizionali zinc-finger della famiglia Gli (Gli1, Gli2 e Gli3) permettendone la traslocazione nucleare e la conseguente attività trascrizionale (**Fig.3**). Alcuni dei

FIG.3

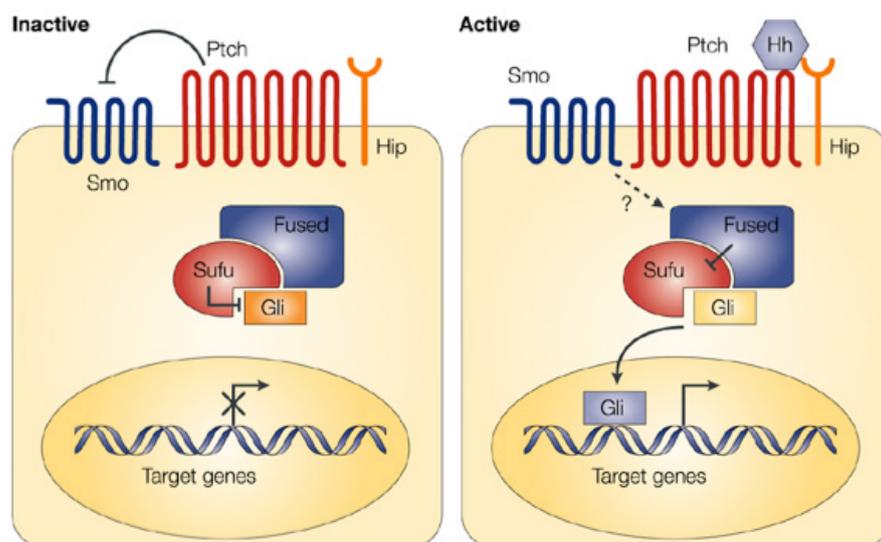


Fig.3: modello del signaling di Hedgehog.

Il legame di Shh al suo recettore è fondamentale per attivare il signaling di Hedgehog. Infatti, in assenza del ligando la pathway è inattiva (figura a sinistra). L'interazione di Shh con il suo recettore Patched interrompe l'azione inibitoria di Patched sul co-recettore Smoothened (figura a destra) e permette l'avvio della cascata enzimatica che porta all'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia Gli.

target trascrizionali di Gli1 sono coinvolti sia nella pathway di Hh come Hip, Ptch, BMP e lo stesso Gli1 (Hooper, J.E. et al 2005), sia nel controllo delle più importanti funzioni cellulari come la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza (ciclinaD1 e D2, Igf2, PDGFR α , c-myc, N-myc, Bmi1, Wnt, Hes1, Bcl2). L'attivazione di Hh risulta ben caratterizzata in *Drosophila*, mentre nei vertebrati la regolazione dei fattori Gli non è stata ancora ben chiarita, soprattutto a causa della complessità che presenta il sistema. Il segnale Smo-dipendente, ad esempio, viene attivato da diverse proteine coinvolte sia nel traffico intracellulare (GRK2, beta-arrestina2, KIF3a, IFT88 e IFT172), sia nelle funzioni del citoscheletro (MIM\BEG4) che nel trasferimento di Gli1 all'interno del nucleo (Dyrk1, Iguana) (Ruiz i Altaba, Palma et al. 2002; Hooper and Scott, 2005). La scoperta di questo complesso meccanismo è risultata molto importante poiché alterazioni a livello delle singole proteine che compongono la pathway di Hh possono giocare un ruolo critico nel processo tumorigenico e quindi essere considerate come potenziali target terapeutici. Shh viene secreto e prodotto dalle cellule del Purkinje ed agisce in questo contesto da fattore mitogeno promuovendo l'espansione delle cellule progenitrici dei granuli (GCPs) (Ho and Scott, 2002) **(Fig.2)**. I meccanismi che prevengono l'attivazione della pathway di Hh o che ne determinano lo spegnimento, rappresentano un'area di studio di ampio interesse. Infatti è proprio su questi meccanismi che agiscono i segnali che, dopo l'iniziale fase proliferativa, permettono alle GCPs di sottrarsi al potente effetto mitogeno di Shh e quindi di uscire dal ciclo cellulare e differenziare. È stato dimostrato, infatti, che l'attività di Hedgehog viene interrotta a livello dello strato più interno dell'EGL (inner EGL) del cervelletto: questa è la zona in cui si trovano le cellule che hanno intrapreso il loro programma differenziativo verso la formazione dei granuli maturi e che parallelamente hanno iniziato la migrazione verso l'IGL. In accordo con questo dato, l'espressione del fattore trascrizionale Gli1, effettore della pathway, risulta ristretta alle GCPs proliferative dell'EGL esterno (outer EGL), ed è silente nello strato interno dell'EGL. Studi condotti negli ultimi anni hanno individuato e descritto alcuni di questi meccanismi inibitori. È stato per esempio dimostrato che, in assenza di Shh, Gli1 è trattenuto nel citoplasma dalla chinasi Kif2: in questo modo la chinasi impedisce che avvenga la traslocazione di Gli1 nel nucleo impedendone di fatto la sua attività trascrizionale. Un simile meccanismo d'azione media il potente effetto inibitorio della proteina citoplasmatica SUFU (Suppressor

of Fused) che lega Gli1 e lo sequestra nel citoplasma (Ding et al. 1999; Kogerman, Grimm et al. 1999; Cheng and Bishop 2002). Un'altra molecola di recente individuazione, REN, è in grado di regolare negativamente la traslocazione di Gli1 nel nucleo (Di Marcotullio et al., 2004).

Lo sforzo profuso dalla ricerca nella comprensione di questi meccanismi è giustificato dalla loro rilevanza nei processi di tumorigenesi. È stato infatti ampiamente dimostrato che una deregolazione dei meccanismi molecolari sottesi all'attivazione della pathway di Hedgehog, può portare ad una proliferazione incontrollata delle GCPs risultante in un processo di trasformazione neoplastica (Ruiz i Altaba et al. 2002).

Alcune informazioni riguardo i meccanismi molecolari coinvolti nel medulloblastoma derivano dall'associazione con due sindromi congenite: la sindrome di Gorlin e la sindrome di Turcot. La sindrome di Gorlin è una malattia genetica autosomica dominante in cui il 3-5% dei pazienti sviluppano medulloblastoma. Pazienti affetti da questa sindrome mostrano una mutazione nel cromosoma 9 nella regione 22.3 dove è localizzato il gene PTCH1 codificante per il recettore transmembrana che regola l'avvio del signaling di Hedgehog. Mutazioni a carico del gene PTCH1 portano ad una attivazione costitutiva del signaling causando, nel cervelletto, un aumento della proliferazione delle cellule precursori dei granuli. L'identificazione di mutazioni di PTCH nei pazienti con la sindrome di Gorlin ha portato velocemente alla ricerca di altre mutazioni di geni coinvolti nella pathway di Hedgehog come SUFU e Smoothened. L'altra malattia genetica, associata allo sviluppo di medulloblastoma, la sindrome di Turcot, è caratterizzata da difetti nella pathway di Wingless. Pazienti affetti da questa sindrome, mostrano mutazioni nel gene APC, un regolatore della beta-catenina.

L'insorgenza di medulloblastoma è associata anche ad alterazioni cromosomiche importanti come quelle descritte a carico del cromosoma 17, che nella maggior parte dei casi prevede la perdita del braccio corto (17p), o la sovrapposizione testa-testa di due bracci lunghi, dando luogo alla formazione dell'isocromosoma 17 q [i(17q)], un tipo di mutazione osservata anche in altre forme tumorali (leucemie, linfomi, carcinoma del colon). Queste osservazioni, confermano ulteriormente l'ipotesi che diversi geni oncosoppressori possono essere localizzati in questa regione cromosomica, la cui perdita sarebbe coinvolta nell'insorgenza del tumore (Scotting et al., 2005; Dhall, 2009; Barayawno et al., 2010).

2.3 Ruolo della pathway di Hedgehog nella tumorigenesi del medulloblastoma.

È stato dimostrato che il medulloblastoma deriva dalla proliferazione incontrollata dei precursori dei granuli cerebellari presenti nella prima fase dello sviluppo del cervelletto. L'analisi dell'espressione genica mediante microarray del medulloblastoma indica, infatti che il tumore presenta caratteristiche simili alle cellule dei granuli embrionali. L'aver individuato la pathway di Hedgehog come responsabile del mantenimento e l'auto-rinnovamento dei precursori delle cellule dei granuli (GCPs) durante lo sviluppo del cervelletto suggerisce un suo coinvolgimento nel processo di tumorigenesi. Come è stato evidenziato da diversi studi, tra cui quelli condotti da Ruiz e Altaba (2002), una sua attivazione aberrante potrebbe determinare la permanenza delle GCPs in uno stadio indifferenziato e portare allo sviluppo del tumore. Sono molteplici le evidenze sperimentali a sostegno di questa tesi:

1) Studi condotti dal laboratorio di Wechsler-Reya and Scott (1999) hanno evidenziato il potente effetto mitogeno ed antidifferenziativo di Shh sui precursori dei granuli del cervelletto. È stato dimostrato come Shh sia in grado di stimolare la proliferazione dei granuli in coltura e di inibirne la differenziazione come dimostra la riduzione dell'espressione dei marker neuronali quali, ad esempio Neu-N. D'altro canto il blocco dell'attività di Shh in vivo tramite anticorpi anti-Shh provoca la diminuzione della loro proliferazione.

2) In alcuni modelli murini la delezione del gene codificante il recettore di Shh, la proteina transmembrana Patched, che svolge in assenza del suo ligando un ruolo inibitorio, è responsabile di gravi alterazioni durante il corso dell'embriogenesi. Se espressa in omozigosi i topi mostrano difetti multipli al tubo neurale, al cuore e ad altri tessuti e muoiono al decimo giorno di vita embrionale (Goodrich et al.,1997). Se espressa in eterozigosi è compatibile con la vita ma i topi sviluppano medulloblastoma intorno al quarto-sesto mese di vita post-natale con un'incidenza del 15-20% (Goodrich et al.,1997; Oliver et al.,2005). Tale incidenza, in topi Ptc^h+/-, viene notevolmente diminuita dall'inattivazione di entrambi gli alleli della

proteina Gli1, fattore trascrizionale che svolge un ruolo fondamentale come effettore della cascata di Shh (Methot and Blaser 2000).

3) I mutanti Ptch vengono utilizzati per capire l'origine cellulare del medulloblastoma. La delezione del gene Ptch nelle cellule precursori dei granuli causa un'espansione dello strato esterno germinale (EGL) dove le cellule dei granuli si sviluppano. La delezione del gene Ptch in cellule staminali multipotenti porta all'espansione della popolazione cellulare staminale, ma solo le cellule staminali che sono destinate a diventare cellule dei granuli continuano a dividersi e a formare tumori (Yang et al., 2008).

4) Il trattamento di cellule di medulloblastoma con la ciclopamina, un alcaloide vegetale, determina la riduzione della loro capacità proliferativa. Questo effetto è dovuto alla inibizione della pathway di Hedgehog. Come dimostrato, infatti, da studi condotti da Ruiz e Altaba et al., la ciclopamina è in grado di inibire il corecettore Smoothed impedendogli, anche in presenza di Shh, di dare avvio alla cascata enzimatica che porta all'attivazione dei fattori trascrizionali della famiglia Gli. Di conseguenza, questo alcaloide previene l'espressione dei geni target della pathway di Hedgehog.

5) La down-regolazione dell'espressione del fattore trascrizionale Gli1 riduce l'attività mitotica di cellule di medulloblastoma. È stata infatti dimostrata *in vitro*, attraverso saggi di proliferazione cellulare, una riduzione dell'incorporazione di Bromodeossiridina da parte di cellule neoplastiche in risposta al silenziamento della espressione di *Gli1* tramite RNA interference (Di Marcotullio et al., 2004).

A tali evidenze sperimentali corrisponde, nella clinica, il riscontro di una deregolazione della pathway di Hedgehog presente nel 60% dei medulloblastomi. Alcune delle alterazioni geniche che si correlano all'iperattivazione della pathway di Hedgehog sono sconosciute.

6) Un'altra alterazione genica frequentemente riscontrata nei pazienti affetti da medulloblastoma determina un deficit funzionale della proteina citoplasmatica SuFu (Suppressor of Fused), un potente inibitore di Gli1. SuFu si lega alla proteina Gli1, la sequestra nel citoplasma e ne impedisce la traslocazione all'interno nel

nucleo, inibendone, di conseguenza, l'attività di induttore trascrizionale. Mutazioni a carico di Sufu danno origine ad una proteina non funzionale portando così alla perdita di uno dei meccanismi più importanti che limitano il signaling di Hedgehog.

7) Meno frequentemente si riscontrano mutazioni a carico del co-recettore di Shh, Smoothened. Smoothened, in presenza di Shh, dà il via alla cascata enzimatica che porta all'attivazione dei fattori trascrizionali Gli. In assenza di Shh, Smoothened è inibito dal recettore Patched1. Le mutazioni riscontrate nei pazienti rendono Smoothened insensibile all'effetto inibitorio di Patched1. Il guadagno di funzione che ne deriva si traduce in uno stato di attivazione continuo della pathway di Hedgehog indipendente dalla presenza del ligando Shh.

8) Infine, in alcuni pazienti, sono riscontrabili mutazioni del gene codificante per Gli1 che determinano una overespressione della proteina con conseguente eccessiva attivazione dei geni target della pathway di Hedgehog.

Tuttavia, è necessario osservare che solo nel 25% dei pazienti con medulloblastoma Hedgehog-dipendente, è stata riscontrata la presenza di mutazioni a carico di proteine direttamente coinvolte nella pathway (Ellison 2002; Taylor et al. 2002). Ciò suggerisce l'esistenza di eventi addizionali, genetici ed epigenetici che, in qualche modo, controllano il signalling di Hedgehog.

A tale riguardo, studi recenti sulla correlazione tra la pathway di Hedgehog e la tumorigenesi dimostrano che un ruolo importante sia svolto da meccanismi deputati alla regolazione della stabilità della proteina Gli1 (Huntzicker et al., 2006). Questi studi hanno infatti dimostrato l'esistenza di una correlazione tra l'aumento dei livelli intracellulari di Gli1, dovuti al fallimento dei meccanismi di degradazione ubiquitina-dipendenti, e l'instaurarsi di un processo di trasformazione neoplastica in cellule Hedgehog-sensibili.

2.4 Il processo di ubiquitinazione

L'ubiquitinazione è un fine meccanismo molecolare proposto alla regolazione delle più importanti funzioni cellulari, come la replicazione e il riparo del DNA, la trascrizione, la proliferazione e il differenziamento, l'apoptosi, la risposta immunitaria, l'endocitosi e la traduzione del segnale (Scheffner et al., 1990; Ghosh et al., 1998).

L'ubiquitinazione è una modificazione post-traduzionale che prevede la formazione di un legame covalente tra l'ubiquitina, un polipeptide di 76 aminoacidi, altamente conservato nell'evoluzione, ed uno specifico substrato proteico. Attraverso la reazione di ubiquitinazione, l'ubiquitina viene coniugata alle proteine accettrici tramite la formazione di un legame isopeptidico tra l'estremità C-terminale dell'Ub (residuo di glicina 76) e l'aminogruppo del residuo di lisina del polipeptide coinvolto nella reazione (Pickard, 2001). Ciò costituisce per la cellula un segnale indicante il destino a cui la data proteina dovrà andare incontro (Hershko and Ciechanover, 1998).

Il meccanismo di ubiquitinazione è un processo enzimatico complesso che richiede l'azione sequenziale di differenti enzimi: E1, enzima di attivazione dell'Ub; E2, enzima di coniugazione dell'Ub; E3 (ubiquitina-ligasi), enzima di legame dell'Ub (**Fig.4A**).

Nella maggior parte delle cellule eucariotiche esiste una sola isoforma di E1 che partecipa a tutte le reazioni. Il legame che porta all'attivazione dell'ubiquitina prevede inizialmente la formazione di un intermedio adenilato in presenza di Mg-ATP (che aumenta l'affinità di E1 all'ubiquitina) e, successivamente, la formazione di un legame tioestere ad alta energia tra l'ubiquitina ed un residuo di cisteina situato nel sito attivo dell'enzima E1. L'ubiquitina così attivata viene trasferita al residuo attivo (una cisteina) dell'E2 che la lega transitoriamente, e la veicola verso una specifica E3 ligasi. L'ultima fase del processo è catalizzata dall'enzima E3 e prevede la formazione del legame isopeptidico tra l'estremità C-terminale dell'ubiquitina, precedentemente attivata, e l' ϵ -aminogruppo al residuo di lisina della proteina accettrice (Hershko and Ciechanover, 1998). Ogni E2 (ne esistono numerose isoforme nella cellula) interagisce solo con poche E3 attraverso il riconoscimento di uno specifico dominio dell'E3 stessa. Questo meccanismo di riconoscimento consiste in un primo livello di selezione dei substrati che si

perfeziona successivamente nel legame ancor più specifico tra l'E3 e la proteina bersaglio. In base al tipo di dominio di interazione con l'E2 si distinguono due classi di E3-ligasi: le RING finger E3-ligasi e le HECT E3-ligasi.

RING è l'acronimo di "Really Interesting New Gene". Le E3-ligasi di questa famiglia presentano un dominio con struttura zinc-finger grazie ad una sequenza di istidine e arginine, che legano due ioni zinco (Pickart 2001). Le E3-ligasi di questa famiglia si distinguono ulteriormente in due classi: RING "a singola subunità", che legano sia l'E2 sia il substrato in maniera diretta (attraverso un dominio diverso dal Ring) e RING "a subunità multiple" che cooperano con altre proteine con formazione di un complesso, delegando ad una di esse il compito di reclutare il substrato.

Di quest'ultimo gruppo un esempio rappresentativo è il complesso SCF (Skp1, Cul1, F-box) composto dalle seguenti proteine: Cullina 1 (appartenente alla famiglia delle culline), la RING Rbx1/Roc1, la proteina "adattatore" Skp1 e una proteina F-box responsabile del legame con il substrato (Lorick et al., 1999) **(Fig.4B)**.

Oltre al complesso SCF, esiste anche un altro complesso denominato ECS (ElonginaC, Cul2, SOCS-box) caratterizzato dalla presenza della Cullina 2. Nei complessi SCF e ECS, le proteine adattatori Skp1 e Elongina C, mediano l'interazione tra la cullina e la proteina coinvolta nel riconoscimento del substrato: F-box, per il complesso SCF, e SOCS per il complesso ECS. Queste "proteine adattatore" legano il substrato attraverso distinti domini d'interazione proteina-proteina (per es. regioni ricche di leucina denominate LRR per l'F-box.). Studi recenti hanno dimostrato che Skp1 ed ElonginaC mostrano una struttura simile al dominio proteico BTB (Shulman et al., 2000) individuato, in *Drosophila Melanogaster*, in un fattore di trascrizione denominato Bric e Brac, Tramtrack e Broad Complex (Zollman et al., 1994).

Tutte le specie eucariotiche mostrano un'ampia varietà di proteine che contengono un dominio BTB, tra cui diversi fattori di trascrizione, proteine coinvolte nella regolazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare. L'omologia di struttura tra le proteine BTB, Skp1 ed ElonginaC ha condotto all'ipotesi che le proteine contenenti un dominio BTB potessero interagire direttamente con le Culline. La maggior parte dei genomi eucariotici codifica oltre che per le Culline 1 e 2, anche per le Culline 3,

4, 5. A tale proposito, sono state identificate numerose proteine contenenti il dominio BTB, in grado di interagire in maniera specifica con la Cullina3. Questa classe di proteine forma insieme a Cul3, un complesso denominato SCF-like. **(Fig.4C)**. All'interno di questo complesso, la proteina contenente il BTB, è in grado da sola di mediare l'interazione tra Cul3 e il substrato target dell'ubiquitinazione. Ciò risulta possibile poiché queste particolari proteine BTB possiedono degli elementi di omologia con i dimeri Skp1/F-box o ElonginaC/SOCS-box.

HECT è l'acronimo di "Homologous E6-AP Carboxy Terminus", essendo E6-AP una E3 ligasi presente nelle cellule umane il cui studio ha fornito importanti informazioni sulla struttura del dominio HECT (Scheffner et al., 1990).

Quest'ultimo, costituito da 350 amminoacidi e con una caratteristica conformazione ad L, presenta regioni altamente conservate che comprendono una regione idrofobica, una sequenza di residui che costituiscono un ponte salino intradominio e il sito attivo costituito da quattro residui di cui la cisteina in posizione 830 costituisce il residuo di legame con l'ubiquitina. Il dominio HECT lega l'E2 e svolge attività catalitica. Il legame con il substrato avviene invece in corrispondenza di un altro dominio (Kumar et al., 1999). Informazioni su quest'ultimo sono state ricavate dallo studio della HECT ligasi di lievito Rsp5 che ha il suo omologo nelle cellule umane in NEDD4 (enzima che ha come substrato il canale del sodio sensibile all'amiloide): in entrambe partecipano al reclutamento del substrato una catena laterale idrofobica e i domini WW capaci di legare residui di fosfotirosina presenti in sequenze dette PPXY (Lu et al., 1999). Perché una proteina possa essere un bersaglio per l'ubiquitinazione, oltre a possedere uno o più residui di lisina capaci di legare l'ubiquitina, deve presentare una regione riconoscibile dalle E3 ligasi o "segnale di ubiquitinazione" (Laney and Hochstrasser, 1999). Essa consiste in una sequenza primaria specifica che può essere oggetto di modificazioni post-traduzionali, quali ad esempio fosforilazioni e defosforilazioni, che ne modulano la capacità di interazione con la E3 ligasi.

La criticità dei segnali veicolati dai meccanismi di ubiquitinazione richiede che esistano più livelli di controllo (per esempio la selettività di interazione E2-E3 e E3-substrato) e di modulazione della attività enzimatica. Ne sono esempio, per quanto riguarda le E3 RING, il legame di NEDD8/Rub1 (proteina ubiquitina-like) ad un

FIG.4

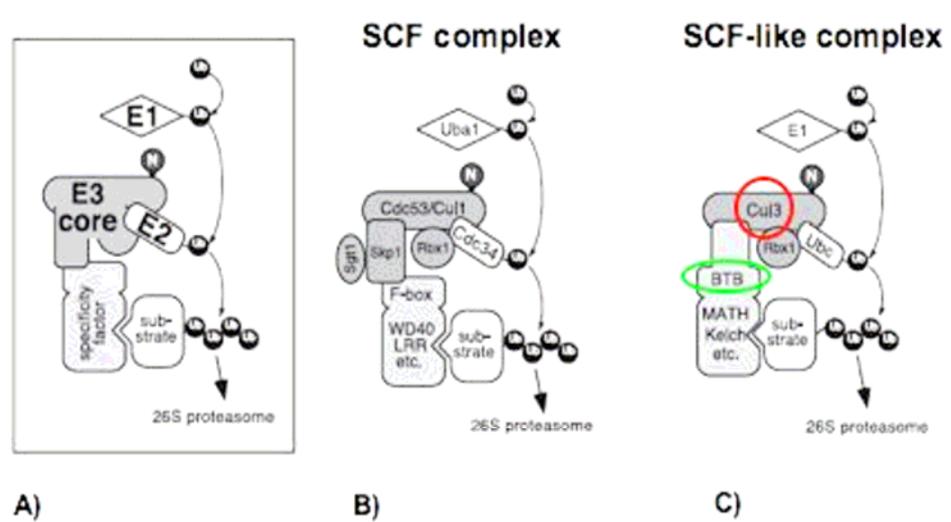


Fig.4

A. Il meccanismo di ubiquitinazione

La reazione di ubiquitinazione è catalizzata da tre enzimi che agiscono in maniera sequenziale: E1, enzima di attivazione dell'ubiquitina; E2, enzima di coniugazione dell'ubiquitina; E3, enzima di legame dell'ubiquitina.

B. Il complesso SCF

Il complesso SCF risulta formato dalle proteina Cullina1, RIN Rbx/Roc1, Skip1 ed F-box. Skip1 media l'interazione tra la Cullina-1 ed F-box, proteina coinvolta nel riconoscimento del substrato per mezzo di un dominio di interazione proteina-proteina:WD40.

C. Il complesso SCF-like

Il complesso SCF-like è formato dalla Cullina3 e da una proteina contenente un dominio BTB, in grado di mediare da sola l'interazione tra la Cullina3 ed il substrato target dell'ubiquitinazione.

residuo di lisina di Cul1, inducendo l'attività dell'SCF complex (Wu et al., 2000) o il legame di Sumo alla E3-ligasi Mdm2, una RING-ligasi a singola sub-unità (Buschmann et al., 2000). Per la famiglia delle HECT il modello maggiormente accreditato e, in alcuni casi dimostrato, è la modulazione tramite interazione proteina-proteina: una proteina adattatrice può far variare l'affinità dell'enzima nei confronti del substrato facilitando il reclutamento e determinando l'aumento di stabilità del complesso.

Il ruolo maggiormente studiato ed attribuito al meccanismo di ubiquitinazione riguarda il riconoscimento delle proteine bersaglio da parte del proteosoma 26S, che a sua volta è responsabile della degradazione proteolitica di varie proteine cellulari. Il proteosoma è un complesso proteolitico multienzimatico che riconosce come segnale degradativo una catena di almeno quattro molecole di ubiquitina (poliubiquitinazione) legate tra loro attraverso il residuo di lisina 48 dell'ubiquitina. Il legame tra l'ubiquitina e la proteina accettrice costituisce un metodo rapido e reversibile per controllare l'abbondanza cellulare dei livelli proteici.

2.5 L'ubiquitinazione come meccanismo di controllo della pathway di Hedgehog

La regolazione del segnale di Hedgehog attraverso processi di ubiquitinazione è stata identificata per la prima volta in *Drosophila* (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980). L'omologo dei fattori trascrizionali della famiglia Gli è in *Drosophila* il fattore trascrizionale Cubitus Interruptus (Ci). Finora sono stati identificati due meccanismi di ubiquitinazione, entrambi basati sulla attività di E3-ligasi appartenenti alla famiglia delle RING E3-ligasi a subunità multiple. Il primo meccanismo ad essere studiato è stato quello mediato dal complesso SCF costituito dalla F-box Slimb, Skp1 e Cul1. In assenza della attivazione di Hedgehog, Ci viene fosforilata da diverse protein-chinasi quali PKA, GSK3-beta, CK1, quindi riconosciuta ed ubiquitinata dal complesso ed, infine, clivata con produzione di una forma tronca con funzione soppressoria (Jiang and Struhl, 1998).

L'attivazione della pathway di Hedgehog si oppone alla fosforilazione di Ci e inibisce la sua ubiquitinazione permettendo che essa espliciti la sua funzione

attivatoria. Nei vertebrati, il processamento dei fattori di trascrizione Gli avviene in modo simile. Essi vengono, infatti, fosforilati e quindi ubiquitinati dal complesso SCF comprendente la proteina F-box β -TrCP (omologo di Slimb). A differenza di Gli3 e, in minor misura, di Gli2, la cui ubiquitinazione genera per proteolisi frammenti con funzione repressoria, l'ubiquitinazione di Gli1 ne determina la completa degradazione (Huntzicker et al., 2006; Tempe et al., 2006). Il secondo meccanismo di ubiquitinazione coinvolge un'altra proteina della famiglia delle culline, Cul3, capace di interagire con proteine contenenti domini BTB (Broad Complex, Tramtrack, Bric a Brac) (Pintard et al., 2004). Tra queste si ritiene che sia HIB/Roadskill, in *Drosophila*, e SPOP, nei vertebrati, a partecipare alla formazione del complesso. Esso è completato da Roc1, una RING- protein che media il legame con la E2 (Kent et al., 2006). In questo caso non è necessario che il substrato sia fosforilato per essere riconosciuto, inoltre sia l'espressione di HIB che di SPOP sono indotte dalla attivazione della pathway di Hedgehog: si può quindi supporre che questo possa essere un meccanismo di autoregolazione attraverso il quale Hh modula negativamente la risposta da esso stesso indotta.

Nel nostro laboratorio è stato identificato un altro meccanismo di ubiquitinazione di Gli1 indotto da Itch, un' E3-ligasi di tipo HECT. Abbiamo dimostrato che Itch è in grado di interagire con Gli1 e di promuovere la sua poliubiquitinazione. Gli1 va incontro così a una degradazione proteolitica che causa una significativa diminuzione dei suoi livelli proteici intracellulari. Questo a sua volta determina una riduzione nel nucleo dei fattori di trascrizione che attivano il signaling di Hedgehog. È stato inoltre scoperto che il processo di degradazione di Gli1 Itch -dipendente viene favorito dalla "proteina adattatore" Numb che lega sia Gli1 che Itch. La porzione C-terminale del dominio PTB di Numb interagisce con la regione WW di Itch e aumenta la stabilità del complesso con Gli1. Questa interazione favorisce l'ubiquitinazione di Gli1 da parte di Itch e la sua conseguente degradazione proteosoma-dipendente (Di Marcotullio et al., 2006).

Uno degli scopi della nostra ricerca consiste nel caratterizzare i meccanismi molecolari di degradazione ubiquitina-dipendenti di Gli1 promossi dalla proteina Numb e mediati dall' E3-ligasi Itch.

2.6 Itch

Itch è una proteina citoplasmatica che partecipa a processi di ubiquitinazione con funzione di E3-ligasi.

Itch è un membro della famiglia delle E3 ligasi dotate di dominio HECT (Liu, 2004). La sua struttura è ben conosciuta: contiene una regione C2 idrofobica a livello N-terminale, deputata al legame con domini lipidici; quattro domini WW caratterizzati dalla presenza di due residui di triptofano altamente conservati deputati al legame con diversi substrati; il dominio HECT, alla estremità C-terminale, che le conferisce la funzione di E3-ligasi.

Il processo di ubiquitinazione catalizzato da Itch indirizza le proteine alla degradazione endo-lisosomiale o alla degradazione da parte del sistema del proteosoma 26S. Attraverso questo meccanismo Itch partecipa alla regolazione di molteplici funzioni cellulari (Bernassola et al., 2008; Melino et al., 2008; Chang et al., 2006).

Itch svolge un ruolo importante nel modulare la risposta immunitaria come ad esempio nel regolare il differenziamento dei linfociti T. Una conferma di questo viene da modelli murini Itch-deficient nei quali si osservano gravi difetti al sistema immunitario. A tal riguardo sono stati identificati due substrati di Itch: JunB e Notch. JunB è fattore di trascrizione che agisce sui promotori dei geni delle citochine (IL-4, IL-4) causando il differenziamento dei linfociti TH2. Itch, nell'ubiquitinare Jun B, mantiene bassi i livelli di IL-4 contrastando il processo di differenziamento dei linfociti T. D'altra parte un'aberrante espressione di JunB, come risultato di una mutazione di Itch o una sua downregolazione favorisce il differenziamento dei linfociti T in linfociti TH2 causando una anormale risposta allergica. Inoltre Itch regola l'anergia T-cellulare ubiquitinando altre due proteine: la fosfolipasi C- γ 1 (PLC- γ 1) e la proteina chinasi θ (PKC- θ).

Un altro substrato di Itch è rappresentato dalla proteina Notch, un recettore transmembrana di tipo I, che svolge diverse funzioni nel controllare il destino cellulare durante il differenziamento e la morfogenesi. Ad esempio durante lo sviluppo dei linfociti svolge un ruolo importante nel differenziamento dei linfociti T e B. Inoltre promuove l'attività e la sopravvivenza dei linfociti T periferici maturi inducendo l'espressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2, l'inibitore di proteine apoptotiche (IAPs) e attraverso l'attivazione di AKT. Il processo di ubiquitinazione e degradazione proteosoma-dipendente svolge un ruolo

importante nel regolare il signaling di Notch. In seguito ad attivazione la proteina Notch va incontro a un processo proteolitico che provoca il rilascio del suo dominio intracellulare (ICD), che trasloca nel nucleo e promuove l'attivazione di geni target di Notch. Itch ubiquitina proprio questo dominio ICD antagonizzando il signaling di Notch. Un ruolo chiave nel regolare negativamente questo signaling è svolto dalla "proteina adattatore" Numb che coopera insieme a Itch favorendo il processo di ubiquitinazione di Notch.

Inoltre Itch regola positivamente il signaling del TGF- β promuovendo l'ubiquitinazione della proteina Smad2 e favorendo la sua fosforilazione. Il TGF- β modula la proliferazione, il differenziamento e la funzione di tutte le classi di linfociti, macrofagi e cellule dendritiche regolando così la risposta immunitaria.

In questi ultimi anni è emerso il ruolo di Itch anche nei processi di tumorigenesi. Basti pensare, che alcuni suoi targets, come p73 e p63, sono note proteine coinvolte nello sviluppo di tumori. Infatti si può osservare come, in condizioni normali, i livelli proteici di p73 sono mantenuti bassi attraverso l'ubiquitinazione mediata da Itch. In risposta a stress genotossici invece, l'induzione e attivazione trascrizionale di p73 è controllata a livello post-traduzionale e promossa, almeno parzialmente da una down-regolazione di Itch indotta da danno al DNA.

Il coinvolgimento di Itch in processi di morte tumorale risulta evidente nella sua capacità di promuovere l'apoptosi indotta dal fattore- α di necrosi tumorale (TNF- α) attraverso l'ubiquitinazione di una proteina antiapoptotica, inibitore della caspasi 8, c-FLIP.

Itch è inoltre in grado di regolare la traslocazione intracitoplasmatica di alcuni recettori di membrana modulando in questo modo la capacità della cellula di interagire con l'ambiente extracellulare. Alcuni studi hanno evidenziato il ruolo di Itch nel regolare l'endocitosi e la stabilità proteica di ErbB-4, un recettore che appartiene alla famiglia dei recettori di crescita epidermici.

In conclusione, dato il gran numero di targets di Itch, coinvolti in molti processi cellulari, che vanno dalla crescita cellulare, al differenziamento, all'apoptosi, risulta di fondamentale importanza comprendere i meccanismi molecolari attraverso i quali questa E3-ligasi media i processi di degradazione ubiquitina-dipendenti (Yun-Cai Liu, 2007; Bernassola et al., 2008; Melino et al., 2008).

2.7 Numb

Numb è una proteina citoplasmatica altamente conservata nell'evoluzione a cui è riconosciuto un ruolo prominente nella determinazione del destino cellulare e nella differenziazione. Come dimostrato in *Drosophila* (Rogiers and Jan, 2004) e in embrioni di topo (Shen et al., 2002), la sua segregazione asimmetrica tra cellule figlie di precursori neuronali determina un duplice destino: la sua espressione si correla infatti con l'uscita dal ciclo cellulare e con la progressione verso la differenziazione; il suo deficit è invece permissivo per la ulteriore proliferazione.

Diversi studi hanno evidenziato l'influenza di Numb nella neurogenesi e nello sviluppo embrionale (Zhong et al., 2000). A tale riguardo particolarmente significativi sono i risultati degli studi condotti su modelli animali knock-out per Numb. L'inattivazione dell'espressione della proteina è stata ottenuta inserendo a livello degli esoni 5 e 6 del dominio di legame fosfotirosinico una cassetta Neo attraverso un processo di ricombinazione omologa: è stato così prodotto un allele LOF (loss of function) di m-Numb. Il topo omozigote per questa mutazione muore intorno al giorno 11 della vita embrionale, ha dimensioni ridotte (circa la metà rispetto al corrispondente embrione wild type) e presenta un'incompleta chiusura del tubo neurale, una vescicola telencefalica poco prominente e una scarsa produzione di cellule nervose (Zhong et al., 2000).

È stato inoltre dimostrato che la down-regolazione della espressione di Numb indotta nei precursori dei granuli del cervelletto è in grado di inibirne la differenziazione. Il deficit di espressione di Numb determina, in vitro, una evidente riduzione dell'espressione dei marker del differenziamento neuronale da parte di queste cellule. In vivo, la ridotta capacità differenziativa si traduce in un deficit di sviluppo dell'IGL (Internal Granule Layer) del cervelletto in cui i granuli maturi sono normalmente localizzati e nella persistenza oltre il limite temporale fisiologicamente previsto (circa 20 giorni) dell'EGL (External Granule Layer), costituito dai precursori dei granuli.

Nonostante la loro importanza i meccanismi attraverso cui Numb influenza la neurogenesi non sono ancora completamente compresi. Essi risultano infatti particolarmente complessi a causa dei diversi contesti cellulari che agiscono durante lo sviluppo delle cellule neuronali e dei differenti targets di Numb, i quali sono coinvolti con modalità spatio-temporali distinte (Petersen et al., 2002; Li et al., 2003; Petersen et al., 2004). La struttura di Numb suggerisce per essa un ruolo di proteina "scaffold", adattatrice, e si ritiene che sia coinvolta in processi di ubiquitinazione e di endocitosi recettore mediata: è dotata di un dominio amminotermine fosfotirosinico

(PTB) la cui funzione è quella di mediare l'interazione proteina-proteina e presenta una regione carbossi-terminale ricca in Prolina (PPR) contenente tre domini di legame omologhi a Src ed uno omologo di Eps15, proteina coinvolta nei processi di endocitosi.

Ne sono state identificate quattro isoforme con pesi molecolari di 65, 66, 71 e 72 KDa che derivano da processi di splicing alternativo dell' RNA messaggero del gene Numb : una sequenza di 11 aminoacidi inserita nel dominio PTB (PTBi) è assente nelle forme 65 e 71; una sequenza di 49 aminoacidi inserita nella regione PRR (PRRi) è assente nelle isoforme 65 e 66. Per tutte è stata dimostrata l'espressione in vivo. Alle differenze strutturali sembrerebbe correlarsi l'esistenza di ruoli differenti per le quattro isoforme, come suggerisce anche l'evidenza di diversi livelli di espressione e localizzazione: in particolare è nota una maggiore espressione delle isoforme p65 e p66 nel tessuto cerebrale rispetto a p71 e p72.

Uno dei più importanti target di Numb finora descritto è Notch (McGill e McGlade, 2003): la cascata enzimatica di cui essa è effattrice ha un ruolo fondamentale nel differenziamento, nella proliferazione e negli eventi apoptotici in tutte le tappe dello sviluppo, funzionando come meccanismo essenziale di comunicazione tra cellula e cellula. Numb lega Notch impedendone la traslocazione nel nucleo e ne favorisce l'ubiquitinazione da parte di Itch. Da ciò deriva l'inibizione della trasduzione del segnale da essa mediato (McGill e McGlade, 2003). Studi sulla modulazione di Notch da parte di Numb hanno dimostrato una riduzione della capacità del primo di mantenere precursori neuronali in stato indifferenziato come conseguenza dell'espressione di Numb.

Nel nostro laboratorio è stato scoperto un nuovo ruolo di Numb nel controllo del signaling di Hedgehog. Il processo di degradazione della proteina Gli1 mediato dall'E3-ligasi Itch viene favorito dall'azione della "proteina adattatore" Numb. Numb, lega, mediante il dominio PTB la regione WW di Itch e legando anche Gli1 aumenta la stabilità del complesso e favorisce l'ubiquitinazione di Gli1. Diversi esperimenti di ubiquitinazione hanno dimostrato che la formazione di questo complesso aumenta l'ubiquitinazione di Gli1. Conseguenza di tale evento è la diminuzione dei livelli di Gli1 nel nucleo e dei suoi geni target coinvolti nel signaling di Hh. Inoltre in cellule in cui i livelli dell' mRNA di Numb vengono ridotti tramite RNA-interference, si è osservato un aumento dei livelli proteici della proteina Gli1. Numb agisce così come regolatore negativo della pathway di Hedgehog.

Nel confermare il ruolo di Numb nel differenziamento delle cellule progenitrici dei granuli è stata osservata una sua predominante espressione nello strato interno

dell' EGL dove le cellule GCPs arrestano la loro proliferazione e iniziano a differenziarsi e a migrare verso l' IGL. Al contrario l'espressione di Gli1 è limitata alle cellule GCPs dello strato esterno dell' EGL dove le cellule si trovano in uno stato indifferenziato e in continua proliferazione. Inoltre l'espressione di Numb è downregolata in cellule umane o murine primarie di medulloblastoma. Queste osservazioni suggerivano che un inappropriato signaling di Hh, che provoca un'incontrollata proliferazione delle GCPs può essere messo in relazione con il fallimento dei meccanismi di differenziamento controllati da Numb. Numb infatti manifesta attività anti-proliferativa e pro-differenziativa sia su cellule progenitrici dei granuli che su cellule di medulloblastoma. L'insieme dei risultati ottenuti, identifica Numb come un'importante antagonista della pathway di Hh, capace di reclutare Itch e sopprimere così l'attività funzionale di Gli1 (Di Marcotullio et al., 2006).

2.8 Il medulloblastoma e la delezione del cromosoma 17p

Il medulloblastoma, come già precedentemente sottolineato, rappresenta una forma tumorale geneticamente eterogenea, associata, nella maggior parte dei casi, ad una incontrollata attivazione della pathway di Hedgehog. È stato però, messo in evidenza, come, solo nel 25% dei pazienti con medulloblastoma Hedgehog dipendente, è possibile dimostrare la presenza di mutazioni a carico di proteine direttamente coinvolte nella pathway (Ellison 2002; Taylor et al., 2002). Ciò ha suggerito l'esistenza di eventi addizionali, genetici ed epigenetici che, in qualche modo, controllano il signaling di Hedgehog. A tal proposito sono state individuate numerose aberrazioni cromosomiche che, come già evidenziato, sono associate a diverse forme istologiche di medulloblastoma.

La più comune di queste alterazioni, riscontrata nel 50% dei casi, è la delezione del cromosoma 17p (Cogen and McDonald 1996; Bigner et al., 1997). Questa evidenza sperimentale ha suggerito che una delle possibili cause dell'insorgenza del medulloblastoma potrebbe risiedere nella perdita o nell'alterata espressione di geni a carattere oncosoppressore che mappano proprio in questa regione cromosomica.

Nella regione cromosomica 17p risultano essere localizzati, infatti, importanti regolatori cellulari: p53, coinvolto nel promuovere l'arresto della crescita e l'apoptosi; Mnt, un gene oncosoppressore che inibisce l'oncogene Myc; Hic1, un gene che è

frequentemente deleto e ipermetilato nel medulloblastoma. Interessante è che sebbene la delezione allelica del cromosoma 17p sia probabilmente associata alla perdita di uno o più geni oncosoppressori, nessuno dei componenti conosciuti della pathway di Hedgehog mappa in questa regione. Un legame tra la delezione del 17p ed il signaling di Hedgehog proviene dalla scoperta, avvenuta nel nostro laboratorio, della delezione di un nuovo gene oncosoppressore, denominato RENKCTD11, che mappa proprio sul cromosoma 17p e che funziona come repressore della pathway di Hedgehog (De Smaele et al., 2004; Di Marcotullio et al., 2004; Ferretti et al., 2005).

2.9 Il gene oncosoppressore REN^{KCTD11}

Il gene REN^{KCTD11}, mappa sul cromosoma 17p, precisamente nella regione 13.2, e risulta deleto nel 40% dei medulloblastomi sporadici fino ad ora analizzati (Di Marcotullio et al., 2004) (**Fig.5**). Ren^{KCTD11}, inizialmente identificato attraverso una tecnica di screening mirata ad individuare geni differenzialmente espressi, si presentava regolato durante la conversione neurotipica mediata dall'epidermal growth factor (EGF), in una linea cellulare murina di stroma timico, TC-1S, di derivazione della cresta neurale (Screpanti et al. 1995; Vacca et al. 1999; Giannini et al. 2001). L'analisi dell'espressione di REN^{KCTD11} durante le varie fasi dello sviluppo embrionale di topo ne hanno evidenziato il ruolo nella neurogenesi. REN^{KCTD11} è, infatti, inizialmente presente nelle cellule del neuroectoderma delle pliche neurali e successivamente estende la sua presenza alle cellule neuroepiteliali attraverso il tubo neurale e le vescicole encefaliche; risulta evidente, quindi, un suo stretto coinvolgimento con i processi neurogenetici delle fasi precoci dello sviluppo. In seguito, durante la gastrulazione, REN è presente negli abbozzi delle creste neurali e quindi nei loro derivati (per es. gangli della radice dorsale e ganglio del trigemino) (Gallo et al., 2002). Un'ulteriore conferma del coinvolgimento di REN^{KCTD11} nel controllo del differenziamento neurale deriva dall'osservazione che la sua espressione è indotta in cellule embrionali pluripotenti ed in linee cellulari dei progenitori neurali in seguito a trattamento con fattori di crescita neurogenici quali acido retinico (RA), nerve growth factor (NGF), EGF, noti svolgere un ruolo critico nella proliferazione e nel differenziamento. Queste evidenze sperimentali, insieme alla particolare localizzazione cromosomica e alla delezione allelica mostrata nel 40% di medulloblastoma, hanno portato ad indagare il coinvolgimento di REN^{KCTD11} nello

FIG.5

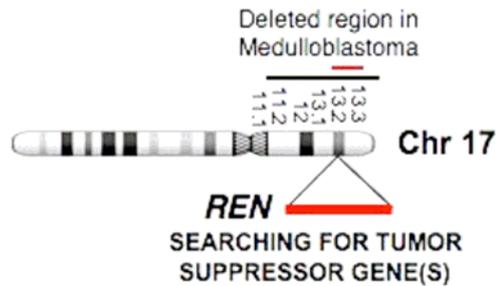


Fig.5: Localizzazione cromosomica di Ren^{KCTD11}

Il gene oncosoppressore Ren^{KCTD11} mappa sul cromosoma 17p, nella regione 13.2, in cui risultano essere localizzati altri geni oncosoppressori.

FIG.6

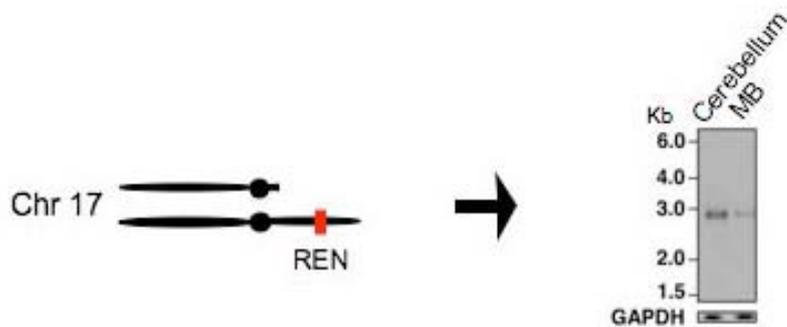


Fig.6: L' espressione di Ren^{KCTD11} è ridotta in cellule di medulloblastoma

L'espressione di Ren è significativamente ridotta nelle cellule di medulloblastoma rispetto ai tessuti normali come conseguenza della delezione allelica e del silenziamento genico (Di Marcotullio et al., 2004).

sviluppo di questa neoplasia ed il suo ruolo come regolatore negativo del signaling di Hedgehog durante lo sviluppo del cervelletto.

2.10 REN^{KCTD11} come antagonista di Hedgehog

L'identificazione del gene oncosoppressore REN^{KCTD11} e la mutazione allelica riscontrata nel medulloblastoma, ne ha fatto sospettare il suo coinvolgimento nella pathway di Hedgehog durante lo sviluppo del cervelletto. È stato osservato, a conferma di questa ipotesi, che REN^{KCTD11} è espresso a più alte concentrazioni nei granuli non proliferanti dell'EGL interno e dell'IGL, piuttosto che in cellule altamente proliferanti dell'EGL esterno (Argenti et al., 2005). In accordo con ciò, l'aumentata espressione di REN^{KCTD11} porta alla differenziazione delle GCPs in vitro, promuove l'arresto della crescita ed aumenta la proporzione di GCPs p27/Kip positive ed riduce la trascrizione dei geni Gli2-dipendenti e dei geni target di Gli1, antagonizzando così gli effetti indotti da Shh sulla proliferazione e differenziazione di GCP in coltura (Argenti et al., 2005). Al contrario, il knock-down funzionale di REN^{KCTD11} ne annulla l'effetto sulla differenziazione, sostenendo al contrario la proliferazione delle GCPs (Argenti et al., 2005). Tutte queste evidenze, suggeriscono che REN^{KCTD11} rappresenta un antagonista della pathway di Hedgehog e che una sua delezione possa alterare la regolazione del signaling, favorendo lo sviluppo del medulloblastoma. L'espressione di REN è infatti significativamente ridotta non solo in linee cellulari di medulloblastoma, ma anche in tutti i tessuti analizzati come conseguenza della delezione allelica e del silenziamento genico (Di Marcotullio et al., 2004) (**Fig.6**). Dagli studi condotti nel nostro laboratorio, risulta evidente che REN è, inoltre, in grado di sopprimere la crescita di cellule di medulloblastoma sia in vitro che in vivo attraverso l'inibizione dell'attività trascrizionale di Gli1 (Di Marcotullio et al., 2004) (**Fig.7**). REN è capace, infatti, di trattenere Gli1 nel citoplasma, impedendone la traslocazione nel nucleo ed antagonizzando, in questo modo, la trascrizione mediata da Gli1 dei geni target di Hh, tra cui anche Gli1 stesso (Di Marcotullio et al., 2004). È noto, infatti, che uno dei meccanismi principali attraverso il quale viene controllata l'attività di Gli1 è rappresentato proprio dalla regolazione del suo shuttling nucleo citoplasma (Kogerman et al. 1999). Sebbene in condizioni basali, REN e Gli1 co-localizzino soprattutto nel citoplasma, non è stata osservata un'interazione fisica tra le due proteine, questo fa supporre che REN inibisca l'attività di Gli1 attraverso meccanismi indiretti (Di Marcotullio et al., 2004). Nell'ambito di questi esperimenti, è

FIG.7

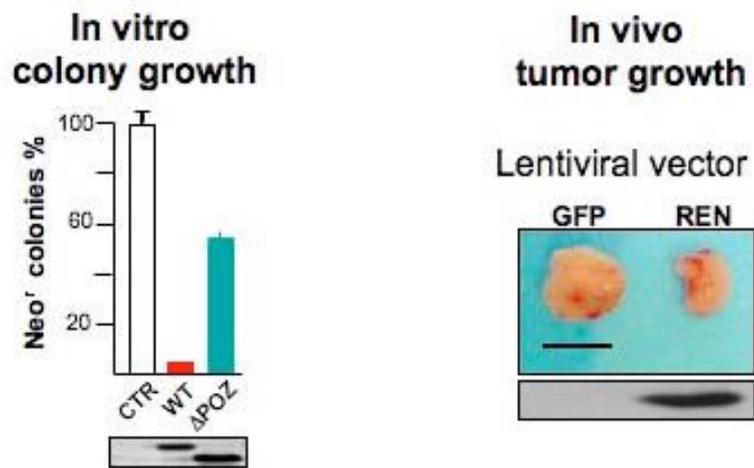


Fig.7: Ren è in grado di sopprimere la crescita di cellule di medulloblastoma sia *in vitro* che *in vivo* attraverso l'inibizione dell'attività trascrizionale di Gli1 (Di Marcotullio et al., 2004).

stato inoltre identificato, nella regione N-terminale, un dominio BTB/POZ, noto mediare l'interazione proteina-proteina, che risulta essere fondamentale affinché REN possa svolgere la sua funzione inibitoria sulla crescita. La delezione di questo dominio determina, infatti, l'abrogazione della capacità di REN di inibire l'attività trascrizionale di Gli1 e di sopprimere la crescita cellulare (Di Marcotullio et al., 2004). Nonostante queste evidenze sperimentali, le modalità con cui REN agisce nell'inibire la pathway di Hedgehog risultavano ancora poco chiare.

3. RISULTATI

PRIMA PARTE

Numb promuove l'attività di Itch nel controllare la funzione di Gli1 attraverso un nuovo segnale di degradazione.

Nel mio lavoro di tesi mi sono proposta di studiare i meccanismi di regolazione ubiquitina-dipendenti di Gli1, focalizzando l'attenzione sulle attività dell'E3-ligasi Itch e della "proteina adattatore" Numb. Studi condotti precedentemente nel nostro laboratorio hanno portato all'identificazione di Itch come una delle E3-ligasi responsabile dell'ubiquitinazione di Gli1 e della successiva degradazione proteolitica operata dal proteosoma (Di Marcotullio et al., 2006). Dal momento che Gli1 è l'effettore finale del signaling di Hedgehog determinante nei processi tumorigeneci, la regolazione fisiologica dei suoi livelli cellulari deve essere finemente modulata, allo scopo di prevenire fenomeni di trasformazione neoplastica. In questa ottica risulta interessante identificare e studiare i meccanismi di regolazione della sua E3-ligasi Itch e delle molecole coinvolte nella sua attivazione. Il ruolo fondamentale non solo di Itch, ma della "proteina adattatore" Numb e quindi dell'asse Gli/Itch/Numb nell'insorgenza del medulloblastoma, ci ha portato ad approfondire la funzione ed i meccanismi di azione di questi importanti regolatori del signaling di Hedgehog.

3.1 Numb promuove l'attività catalitica di ITCH

Nel nostro precedente lavoro è stato identificato Numb come componente del complesso di ubiquitinazione Gli1-Itch (Di Marcotullio et al., 2006). Tuttavia, il ruolo di Numb nel promuovere l'ubiquitinazione di Gli1 da parte di Itch non è stato ancora ben caratterizzato.

Itch è un'E3-ligasi di tipo HECT che contiene alla regione N-terminale una regione C2 idrofobica, deputata al legame con domini lipidici, e quattro domini WW, deputati al riconoscimento del substrato, e alla regione C-terminale il dominio HECT, che gli conferisce la funzione di E3-ligasi (**Fig.8A**). Itch può assumere diverse conformazioni

proteiche grazie alle interazioni molecolari tra i suoi domini proteici. Nella conformazione inattiva il dominio C-terminale HECT è ripiegato in modo da legare la regione N-terminale, comprendente la regione PRR (regione ricca in proline) e i quattro motivi WW. Per svolgere la sua attività catalitica, Itch deve assumere una conformazione attiva. Dalla letteratura è noto che eventi posttrascrizionali, quali fenomeni di fosforilazione, possono modificare la configurazione della proteina. Ad esempio alcune chinasi come JNK, fosforilando alcuni siti di Itch all'interno della regione PRR, causano la rottura del legame tra i domini WW e la regione HECT, alterando la forma della proteina e attivandola (Gallagher et al., 2006). Inoltre si è visto come Itch può essere attivato, oltre che da protein-chinasi, anche da altre proteine, che svolgono il ruolo di "proteine adattatori" come ad esempio NDFIP1 che nel legare Itch nel suo dominio WW ne induce un cambiamento conformazionale attivandolo (Mund and Pelham, 2009).

Abbiamo così ipotizzato che anche Numb nel suo ruolo di "proteina adattatore" potesse in qualche modo attivare Itch.

Il primo passo è stato quello di analizzare la specificità di legame tra queste due proteine. Per fare ciò, abbiamo effettuato esperimenti di binding in vitro e in vivo. In letteratura è stato osservato che l'interazione tra Numb e Itch avviene attraverso il dominio PTB di Numb e il WW1 e WW2 di Itch (McGill and McGlade, 2003). Attraverso esperimenti di binding in vitro abbiamo scoperto che solo il WW2 di Itch lega Numb. Sono state così costruite due proteine di fusione in cui, nella prima il dominio WW1 di Itch è stato unito alla proteina glutatione S-trasferasi (GST) e nella seconda il dominio WW2 di Itch è stato unito alla proteina GST. È stato effettuato un esperimento di GST-pull down in cui le cellule della linea HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione codificanti per Numb wt o il mutante Numb Δ PTB (deleto del dominio PTB). Il lisato proteico è stato incubato con la proteina di fusione GST-ItchWW1 o GST-ItchWW2, e con la proteina GST come controllo per 2 ore a 4°C. Dopo una serie di lavaggi, i complessi proteici sono stati corsi su gel e analizzati mediante immunoblotting e come si può vedere dalla figura **8 A** Numb, ma non Numb Δ PTB, è in grado di legare esclusivamente il WW2 di Itch (**Fig.8A e 8B**). Perciò ci siamo chiesti se il legame di Numb potesse alterare le interazioni intramolecolari di Itch. Per testare questa ipotesi sono stati effettuati esperimenti di binding in vitro in cui è stata valutata la capacità dell'HECT di legare Itch in presenza o in assenza di Numb. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con il plasmide Myc-Itch in assenza o in presenza del plasmide Flag-Numb wt o Flag-Numb Δ PTB e i lisati proteici immunoprecipitati con anticorpi anti-Myc o anti-IgG ed incubati con

FIG. 8 A

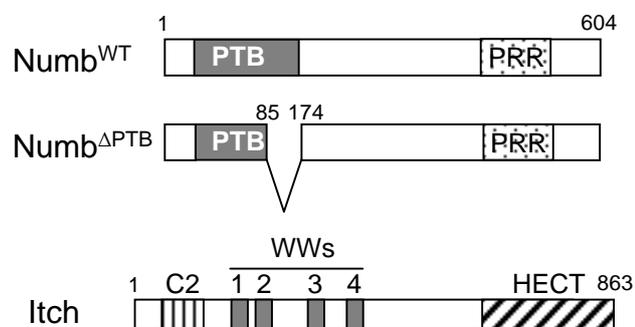


Fig.8 A: rappresentazione schematica delle proteine Numb e Itch.

FIG. 8 B

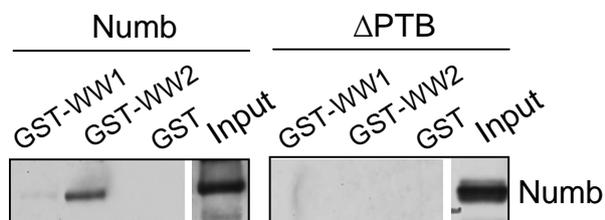


Fig.8 B: Numb lega i domini WW di Itch.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione per Numb WT o Numb^{ΔPTB} e il lisato incubato con GST, GST-ItchWW1 o GST-ItchWW2. Dopo GST pull-down i complessi proteici sono stati analizzati mediante Western blot.

l'HECT-GST. Come si può vedere in figura **8 C**, e come precedentemente dimostrato (Gallagher et al., 2006), l'HECT è in grado di legare Itch. Al contrario la presenza di Numb, ma non del mutante Δ PTB, (incapace di legare Itch), previene il legame tra l'HECT e la regione WW di Itch (**Fig.8C**). Questo risultato suggerisce che Numb sia capace di destabilizzare le interazioni intramolecolari di Itch prevenendo la formazione di uno stato autoinibitorio. Per verificare se questo effetto si traduceva in un cambiamento dell'attività di Itch abbiamo condotto dei saggi di ubiquitinazione in vivo prendendo in considerazione la capacità di Itch di auto-ubiquitinarsi. A tale scopo cellule HEK293 sono state trasfettate con un vettore di espressione dell'ubiquitina (Ub-HA) e il vettore di espressione Itch-Myc in presenza o in assenza di Numb o di Numb Δ PTB. Il complesso è stato immunoprecipitato utilizzando anticorpi anti-Myc e il risultato analizzato mediante Western Blot, utilizzando un anticorpo anti-HA per rilevare le proteine coniugate all'ubiquitina. Come atteso, nei campioni trasfettati con vettori di espressione codificanti per Numb si osserva un aumento dell'attività di auto-ubiquitinazione di Itch, che al contrario non si osserva nei campioni trasfettati con Numb Δ PTB (**Fig.8D**). Tale risultato è stato confermato analizzando un mutante di Itch cataliticamente inattivo (C830A), caratterizzato dalla sostituzione, all'interno del dominio HECT, della cisteina 830 con una alanina, che, anche se in grado di legare il substrato, lo rende incapace di legare l'ubiquitina e svolgere la sua funzione enzimatica (Winberg et al., 2000). Numb, come si evince dalla figura **8E**, in grado di promuovere l'ubiquitinazione di Itch, fallisce nell'ubiquitinazione del mutante inattivo C830A (**Fig.8E**). Questi dati suggeriscono che Numb funziona come una proteina adattatore che legando Itch lo libera dal suo stato auto-inibitorio, attivandolo e favorendo il legame di Itch con il substrato Gli1.

FIG. 8 C

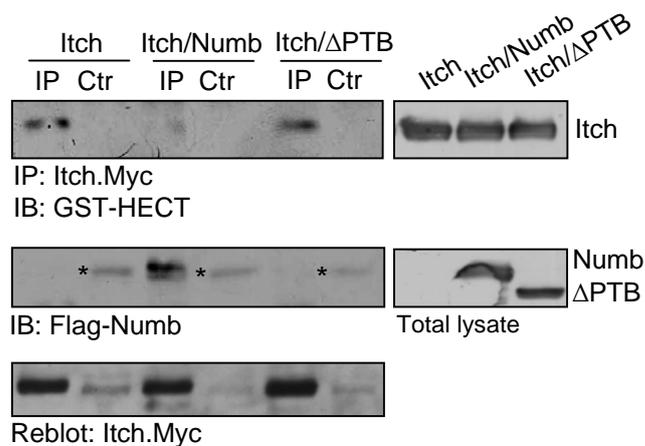


Fig.8 C: interazioni intra-molecolari di Itch.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione per Myc-Itch in presenza o in assenza di Flag-Numb WT o Flag-Numb Δ PTB e immunoprecipitate con anticorpi anti-Myc o anti-IgG (ctr). L'immunoprecipitato è stato incubato con HECT ricombinante. Le proteine che legano l'HECT sono state analizzate attraverso immunoblot utilizzando anticorpi anti-GST. L'interazione tra Itch e Numb viene rivelata utilizzando anticorpi anti-Flag. (*bande aspecifiche).

FIG. 8 D

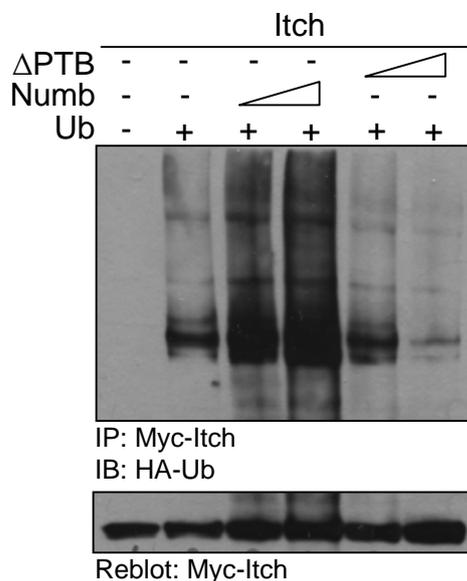


FIG. 8 E

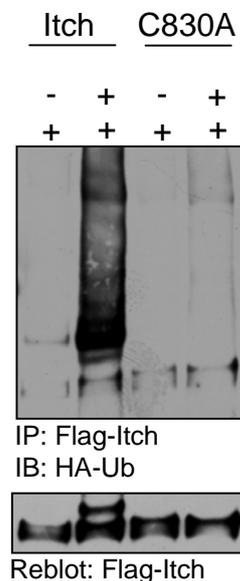


Fig.8 D e 8 E: Numb favorisce l'attività di auto-ubiquitinazione di Itch.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione per Myc-Itch o Flag-Itch o Flag-ItchC830 e un vettore di espressione dell'ubiquitina in presenza o in assenza di Numb o di Numb Δ PTB. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitate con anticorpi anti-Myc o anti-Flag e il risultato analizzato mediante Western Blot, utilizzando un anticorpo anti-HA per le proteine coniugate all'ubiquitina.

3.2 Gli 1 interagisce direttamente con Itch attraverso due distinti motivi PPXY e motivi fosfo-serina/prolina

Le E3 ligasi interagiscono direttamente sia con i loro substrati, sia con l'enzima E2 per facilitare il trasferimento delle molecole di ubiquitina sulle proteine target (Haas and Siepmann, 1997). Per verificare l'abilità di Itch di interagire con Gli1 sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione su proteine endogene. Lisati cellulari derivanti da cellule NIH3T3 sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-Gli1 o con IgG di controllo e l'immunoprecipitato analizzato mediante Western blot. In figura **9A** si può vedere come Gli1 forma un complesso con Itch. In accordo con questo risultato, l'ubiquitinazione endogena di Gli1 diminuiva o aumentava in seguito alla riduzione o all'overespressione di Itch. Questa evidenza era ulteriormente avvalorata da esperimenti di ubiquitinazione in vitro, confermando che Itch rappresenta fisiologicamente l'E3-ligasi di Gli1 (Di Marcotullio et al., 2006). È ormai noto dalla letteratura che l'interazione di Itch con i propri substrati avviene attraverso la regione WW (Qui et al., 2000; Courbard et al., 2002; Fang et al., 2002; Traweger et al., 2002; Ikeda et al., 2003; Magnifico et al., 2003; Chang et al., 2006; Mouchantaf et al., 2006) (**Fig.9A**). Per testare se Gli1, che è quindi un substrato di Itch, lega i WW di Itch sono stati fatti dei saggi di *gst pull-down* in vitro. È stata costruita una proteina di fusione in cui i quattro domini WW di Itch sono stati uniti alla proteina GST (GST-ItchWWs). La proteina Gli1 è stata in vitro traslata e incubata con GST di controllo o GST-ItchWWs; dopo GST pull-down i complessi proteici sono stati corsi su gel ed analizzati mediante fluorografia. Come dimostra il risultato di questo esperimento Gli1 è in grado di legare i WW di Itch (**Fig.9B**).

Per verificare se Gli1 lega tutti e quattro i WW o solo alcuni, sono state costruite altre proteine di fusione di Itch separando i quattro WW e unendo ciascuno di essi con la GST. Si può vedere dalla figura **9C** come Gli1 lega WW1, -2, -4, ma non il WW3 (**Fig.9C**).

Viceversa, al fine di identificare la regione di Gli1 coinvolta nell'interazione con Itch sono stati ripetuti gli esperimenti di GST pull-down utilizzando mutanti di Gli1 deleti nella porzione N terminale o C terminale: dalla figura **9D** si può vedere come solo il Gli1 full-length e due mutanti di Gli1, Gli1 424-1106 e Gli1 755-1106, che contengono entrambi la regione C-terminale di Gli1, legano GST-Itch (**Fig.9D**).

FIG. 9 A

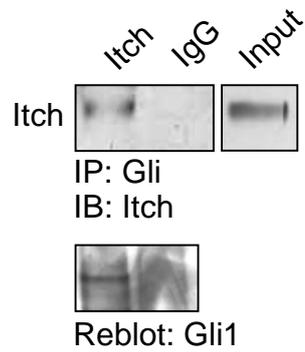


Fig. 9 A: Gli1 forma un complesso con Itch

Lisati cellulari derivanti da cellule NIH3T3 sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-Gli1 o con IgG di controllo e l'immunoprecipitato analizzato mediante Western blot utilizzando anticorpi anti-Gli1 e anti-Itch

FIG. 9 B

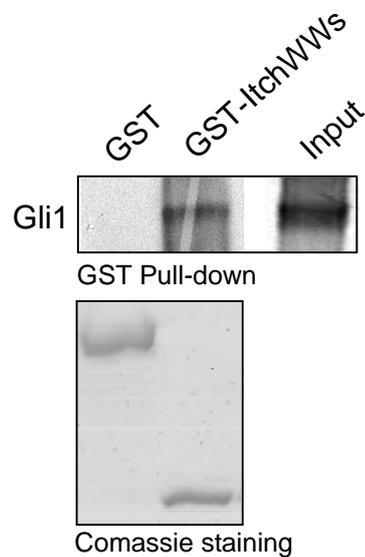


Fig. 9 B: Itch lega Gli1 attraverso i domini WW.

È stata costruita una proteina di fusione in cui i quattro domini WW di Itch sono stati uniti alla proteina GST (GST-ItchWWs). La proteina Gli1 è stata in vitro traslata e incubata con GST di controllo o GST-ItchWWs; dopo GST pull-down i complessi proteici sono stati corsi su gel e sono stati rivelati mediante fluorografia.

FIG. 9 C

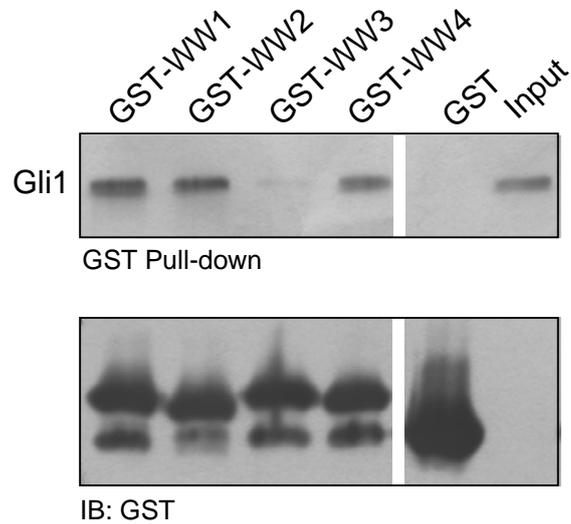


Fig. 9 C: Itch lega Gli1 attraverso i domini WW1-WW2-WW3 di Itch
Sono state costruite diverse proteine di fusione in cui ogni singolo dominio WW di Itch è stato unito alla proteina GST (GST-ItchWW1, -ItchWW2, -ItchWW3, -ItchWW4). La proteina Gli1 è stata in vitro traslata e incubata con GST di controllo o GST-ItchWWs; dopo GST pull-down i complessi proteici sono stati corsi su gel e sono stati rivelati mediante fluorografia.

FIG. 9 D

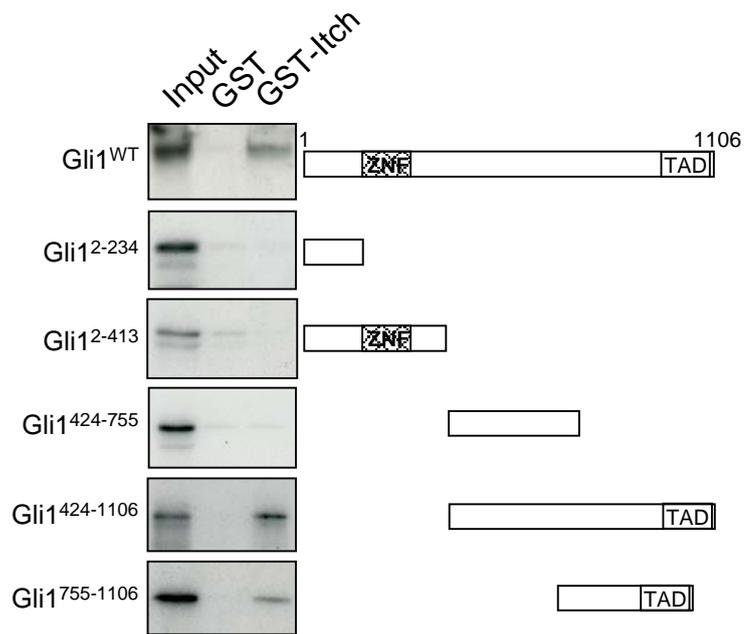


Fig. 9 D: Itch interagisce con la regione C-terminale di Gli1.

Gli1 wt e diversi mutanti di delezione di Gli1 sono stati in vitro traslati e incubati con GST di controllo o GST-Itch; dopo GST pull-down i complessi proteici sono stati corsi su gel e sono stati rivelati mediante fluorografia.

Questa interazione in vitro è stata anche confermata attraverso saggi di co-immunoprecipitazione in vivo. A tal riguardo, cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Myc-Itch in presenza o in assenza di Flag-Gli⁴²⁴⁻⁷⁵⁵ o Flag-Gli⁴²⁴⁻¹¹⁰⁶ e il lisato cellulare immunoprecipitato con anticorpo anti-Flag e analizzato mediante Western blot (**Fig.9E**). Questi risultati indicano che la regione di Gli1 compresa tra gli aminoacidi 755 e 1106 è necessaria per l'interazione con Itch.

I domini WW di diverse ligasi mediano l'associazione con i diversi substrati proteici in corrispondenza di motivi ricchi in proline (Ingham et al., 2004). I domini PPXY o motivi pSP (residui di proline preceduti da fosfoserine) rappresentano siti di legame per diverse E3 ligasi che contengono domini WW, come ad esempio le proteine della famiglia di NEDD4 (Macias et al., 2002 ; Rossi et al., 2005 ; Sudol et al., 2005).

Gli1, nella regione C-terminale che va dall'aminoacido 755 a 1106 contiene due motivi PPXY. Per testare se questi due motivi sono coinvolti nell'interazione con Itch si è costruito un mutante sostituendo le tiroxine 859 e 872 con la fenilalanina (Gli1^{PPXY/F}). Queste mutazioni però, come è dimostrato dalla figura **9F** non alterano la capacità di legame con Itch suggerendo che l'interazione tra Gli1 e Itch richiede ulteriori elementi. È stato così mutato un motivo pSP di Gli1, presente sempre nella regione C-terminale, sostituendo la serina 1060 con un' alanina (Gli1^{Ps1060A}). Come si può vedere dalla figura **9F**, mentre il mutante Gli1^{Ps1060A}, interagisce ancora con Itch, il mutante Gli1, mutato sia nei domini PPXY che nel dominio pSP (triplo mutante, Gli1TM), non lega più Itch (**Fig.9F**). Questi risultati dimostrano che la combinazione di due intatti motivi PPXYs e un motivo pS¹⁰⁶⁰ P rappresentano il sito specifico di legame di Gli1 per Itch.

FIG. 9 E

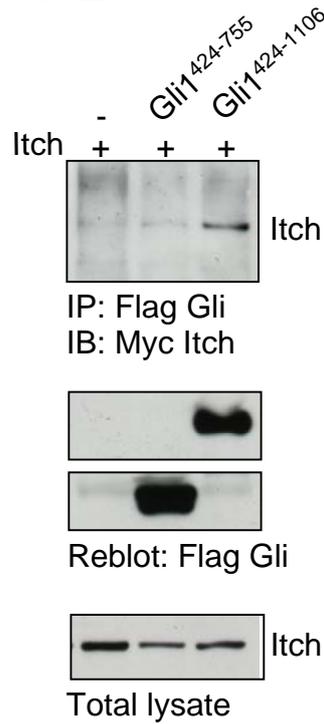


Fig.9 E: Gli1 lega la regione C-terminale di Itch.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione di Myc-Itch in presenza o in assenza di Flag-Gli1⁴²⁴⁻⁷⁵⁵ o Flag-Gli1⁴²⁴⁻¹¹⁰⁶; il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-Flag; l'interazione in vivo tra Itch e il frammento C-terminale di Gli1 è stata rivelata con anticorpo anti-Myc.

FIG. 9 F

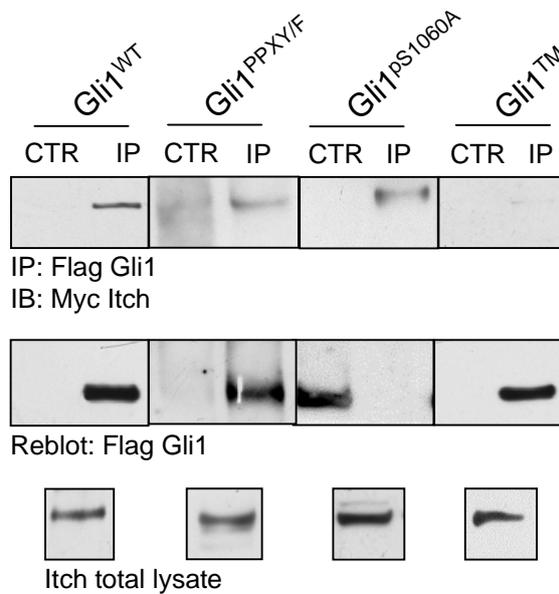


Fig.9 F: I domini PPXY e Psp di Gli1 mediano l'interazione con Itch.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione di Myc-Itch e Flag-Gli1 wt o i mutanti di Gli1 (Gli1^{PPXY/F}, Gli1^{PS1060A} e Gli1TM); il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-Flag e l'interazione proteica è stata rivelata mediante anticorpo anti-Myc.

3.3 Il degrone PPXYs/p SP è richiesto per l'ubiquitinazione di Gli1 da parte di Itch

Una volta identificati i domini di interazione tra Itch e Gli1, il passo successivo è stato quello di individuare la regione di Gli1 specificatamente ubiquitinata da Itch. A tale scopo, è stato effettuato un saggio di ubiquitinazione sulle regioni N-terminali (aa 2-413) e C-terminali (aa 424-1106) di Gli1. Cellule della linea HEK293 sono state co-trasfettate con Flag-Gli1 wt, o Flag-Gli1²⁻⁴¹³, o Flag-Gli1⁴²⁴⁻¹¹⁰⁶, e con il vettore di espressione per l'ubiquitina in presenza o in assenza di Itch. Come mostrato in figura **10A** il dominio C-terminale di Gli1 e il Gli1 full-length sono efficientemente ubiquitinati da Itch a differenza della regione N-terminale, Gli1 2-413 o del mutante, Gli1 424-755 (**Fig.10A**).

Questi risultati dimostrano che la regione C-terminale di Gli1 serve come substrato di ubiquitinazione per Itch e che la regione 755-1106 è richiesta sia per il riconoscimento che per l'ubiquitinazione da parte di Itch.

In accordo con i dati di binding mostrati precedentemente, in cui abbiamo dimostrato che Gli1 mutato sia nei domini PPXY che nel dominio pSP (Gli1 TM), non è più in grado di legare Itch, abbiamo voluto verificare l'effetto di queste mutazioni sulla capacità di Gli1 di essere ubiquitinato da Itch. Come mostrato nella figura **10B**, solo il mutante alterato nei domini PPXYs e nel dominio pSP viene ubiquitinato da Itch (**Fig.10B**). Questi risultati dimostrano che due intatti motivi PPXYs e un motivo pS¹⁰⁶⁰ P sono richiesti oltre che per l'interazione, anche per l'ubiquitinazione mediata da Itch.

FIG. 10 A

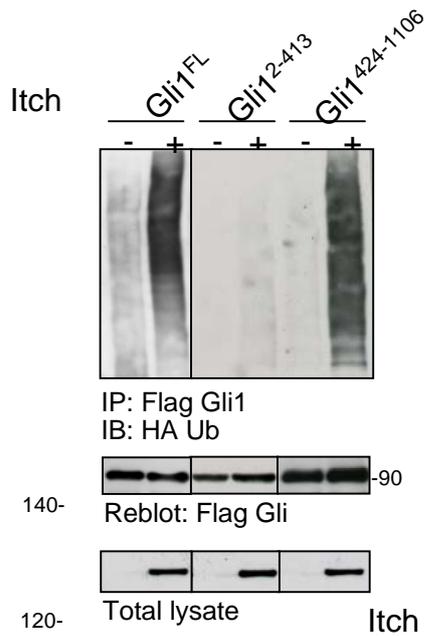


FIG. 10 B

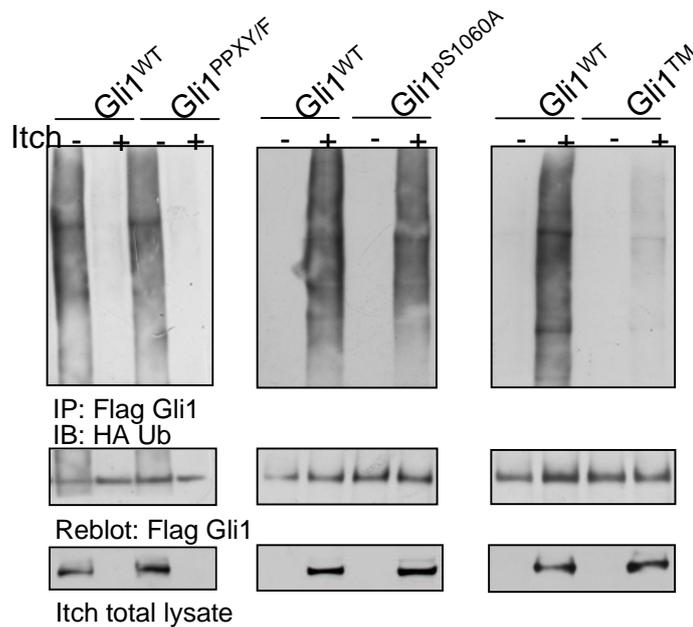


Fig.10 A-B: Itch ubiquitina la regione C-terminale di Gli1 attraverso il degrone PPXYs/pSP

A) Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione di Flag-Gli1 WT o Flag-Gli1 N-terminale (2-413), o Flag-Gli1 C-terminale (424-1106) e con vettore di espressione HA-Ub in presenza o in assenza di Myc-Itch ; il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-Flag; seguito da un Western blot con anticorpo anti-HA per rivelare l'ubiquitina coniugata HA Per confermare l'immunoprecipitazione di Gli1 il filtro è stato ibridato con un anticorpo anti-Flag.

B) Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione di Flag-Gli1 WT o i mutanti di Flag-Gli1 (Gli1^{PPXY/F} , Gli1^{PS1060A} e Gli1TM) e con vettore di espressione HA-Ub in presenza o in assenza di Myc-Itch. È stato condotto un saggio di ubiquitinazione come descritto nel punto A.

3.4 Itch diminuisce l'attività trascrizionale di Gli1 promuovendo la sua degradazione.

L'abilità di Itch ad indurre ubiquitinazione di Gli1 implica un ruolo antagonista sull'attività funzionale di questo fattore di trascrizione. Per correlare queste osservazioni con l'attività trascrizionale di Gli1 sono state costruite due tipi di proteine di fusione: la regione N-terminale di Gli1 che contiene il dominio di legame al DNA fusa al dominio di transattivazione VP16 (Gli1N-VP16); e due differenti regioni C-terminali di Gli1, una dall'aminoacido 424-1106 e l'altra dall'aminoacido 755-1106 fuse al dominio di legame al DNA Gal4 (Gal4-Gli1^{C-700}, 424-1106 aa; Gal4-Gli1^{C-400}, 755-1106 aa.) (**Fig.11A**).

È stato effettuato un saggio luciferasico transfettando nelle cellule Gli1N-VP16 con il gene reporter 12xGli1, contenente 12 siti ripetuti (TGGGTGGTC) responsivi a Gli, posti a monte del gene codificante per la luciferasi, da solo o in presenza di Itch. Il fatto che Itch non è in grado di inibire l'attività della proteina Gli1N-VP16, indica che la regione N-terminale, non essendo ubiquitinata da Itch, non è soggetta neanche a regolazione. Inoltre le cellule sono state anche trasfettate con Gal4-Gli1^{C-700} o Gal4-Gli1^{C-400} con il gene reporter 5xGal4, contenente 5 siti ripetuti a monte del gene codificante per la luciferasi, in presenza o in assenza di Itch. Al contrario, l'attività della proteina Gal4-Gli1^{C-700} e Gal4-Gli1^{C-400} è fortemente inibita dalla presenza di Itch (**Fig.11B**). Questo costituisce un ulteriore conferma del fatto che il sito di Gli1, responsivo a Itch è localizzato funzionalmente nella regione C-terminale. In accordo con questi risultati l'over-espressione di Itch inibisce significativamente l'attività trascrizionale di Gli1 full-length mentre il suo effetto inibitorio è estremamente ridotto nel Gli1 TM (**Fig.11C**). Questo indica che la funzione trascrizionale di Gli1 è determinata dall'interazione di Itch nei domini PPXY e pS¹⁰⁶⁰P. Considerando l'insensibilità di Gli1 TM all'effetto antagonista di Itch, abbiamo voluto verificare la sua stabilità. Abbiamo effettuato un esperimento di Western blot in cui abbiamo analizzato i livelli proteici della proteina Gli1 e del triplo mutante in presenza o assenza di Itch. Possiamo vedere in figura **11D** come la co-espressione di Itch induce un decremento solo dei livelli proteici di Gli1 full-length (**Fig.11D**). Per confermare questo dato sono stati confrontati i livelli proteici delle due proteine in presenza di cicloeximide. Questa sostanza, portando ad un blocco della sintesi proteica, viene utilizzata per determinare l'emivita di targets proteici. Come si può osservare in figura **11E** i livelli proteici di Gli1 WT diminuiscono con l'aumentare del tempo di trattamento con la cicloeximide mentre i livelli di Gli1 TM si mantengono stabili

FIG. 11 A

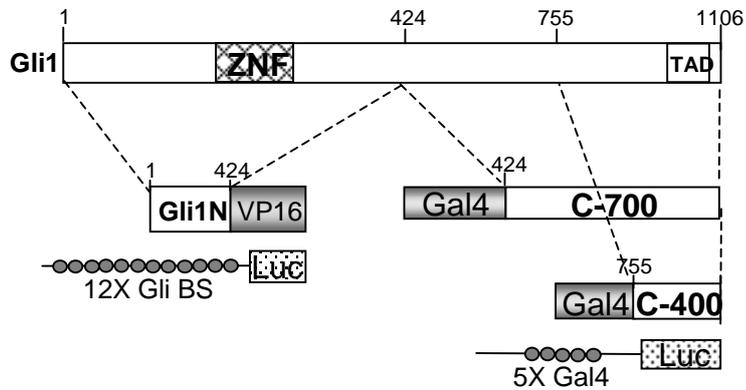


Fig. 11 A: Rappresentazione schematica di Gli1 e i suoi subdomini usati per generare le proteine di fusione Gli1N-terminale VP16 e Gal4 C-Terminale e i loro geni reporter. Gli1 (2-424) viene fuso al dominio al dominio di transattivazione VP16 (Gli1N-VP16) e Gli1 755-1106 (C-4000), Gli1 424-1106 (C-400) fusi al dominio di legame al DNA Gal4.

FIG. 11 B

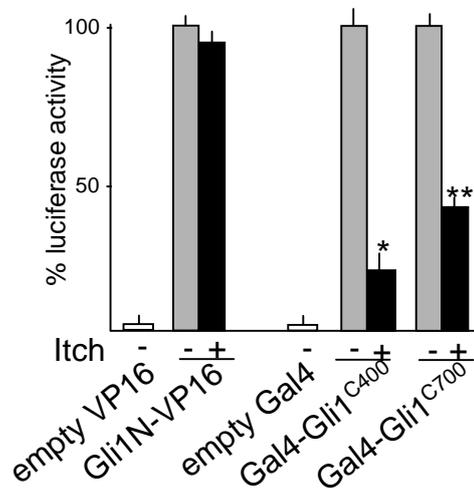


FIG. 11 C

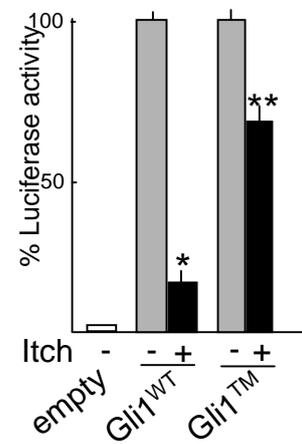


Fig. 11 B/C: Itch inibisce l'attività trascrizionale di Gli1

B) È stato effettuato un saggio luciferasico trasfettando nelle cellule HEK293 Gli1N-VP16 con il gene reporter 12xGli1 da solo o in presenza di Itch e Gal4-Gli1^{C-700} o Gal4-Gli1^{C-400} con il gene reporter Gal4 in presenza o in assenza di Itch.

C) È stato effettuato un saggio luciferasico trasfettando nelle cellule HEK293 Gli1 wt o Gli1 TM con il gene reporter 12xGli1 da solo o in presenza di Itch.

FIG. 11 D

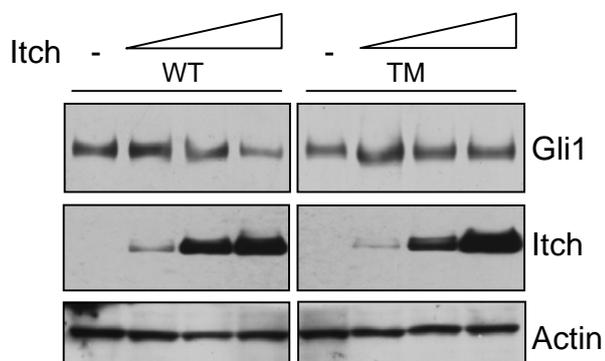


FIG. 11 E

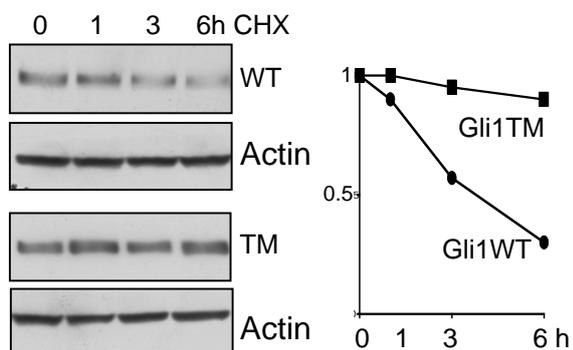


Fig.11 D/ E: Itch promuove la degradazione di Gli1.

D) Livelli proteici di Gli1 WT e Gli1 TM in presenza di quantità crescenti di Itch (0.5, 1, 2 μg).

E) Livelli proteici di Gli1 WT e Gli1 TM in presenza di 30 μg/ml di cicloeximide(CHX) per i tempi indicati. Il grafico rappresenta la quantità di Gli1 di ogni trasfezione nelle cellule non trattate e a seguito del trattamento con la CHX.

(Fig.11E). Questo dimostra che i motivi PPXYs e pS¹⁰⁶⁰P regolano l'attività trascrizionale di Gli1 influenzando la sua stabilità attraverso una pathway dipendente da Itch.

3.5 Numb recluta Gli1 in un complesso ternario con Itch

Per dimostrare se e come Numb, oltre ad attivare Itch, interagisce con Gli1, è stato effettuato un saggio di GST-pull-down, che ha messo in luce la capacità di Numb di legare direttamente Gli1 (Fig.12A).

Inoltre, esperimenti di binding in vitro, condotti utilizzando alcuni mutanti di delezione di Numb ci hanno portato ad identificare nella regione 174-421 quella responsabile dell'interazione con Gli1 (Fig.12B). Tuttavia, lo stesso tipo di esperimenti condotti in vivo, ha mostrato che, il mutante di Numb, delecto di questa regione (174-421), era ancora in grado di legare Gli1, poiché mantiene la regione di legame con Itch (85-174). Infatti solo il mutante delecto della regione 85-421 (Numb Δ 85-421) falliva completamente nel legare il fattore di trascrizione (Fig.12C).

È interessante mettere in evidenza che il mutante Numb Δ PTB, precedentemente dimostrato non legare Itch, e non più in grado di inibire l'attività di Gli1 (Di Marcotullio et al., 2006), mostrava una ridotta capacità nel legare Gli1 rispetto alla proteina Numb WT (Fig.12D).

Questo suggerisce che l'interazione tra le tre proteine è richiesta per stabilizzare l'intero complesso e che Numb, oltre ad attivare Itch, recluta anche Gli1.

FIG. 12 A

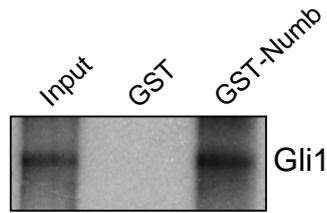


Fig.12 A: Numb interagisce con Gli1

Gli1 è stato in vitro traslato e incubato con GST di controllo o GST-Itch; dopo GST pull-down i complessi proteici sono stati rivelati mediante fluorografia.

FIG. 12 B

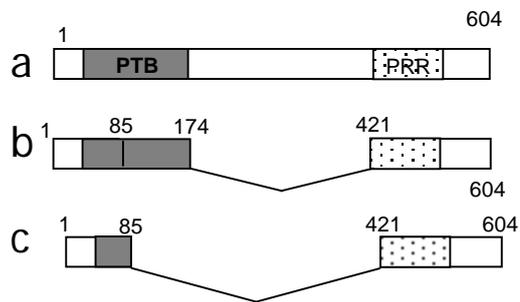


FIG. 12 C

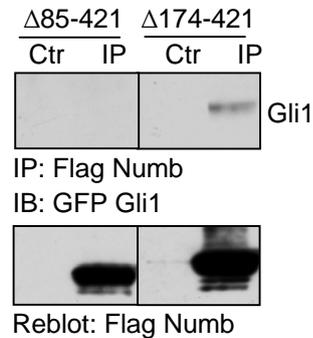


Fig.12 B: Rappresentazione schematica dei mutanti di Numb

a) Numb WT; b) Numb $\Delta 174-421$; c) Numb $\Delta 85-421$

Fig.12 C: legame dei mutanti di Numb con Gli1

Cellule HEK293 sono state trasfettate con Gli1 WT in presenza di FlagNumb WT o i mutanti di delezione di Numb. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-Flag e l'interazione con Gli1 è stata rivelata con anticorpo anti-GFP.

FIG. 12 D

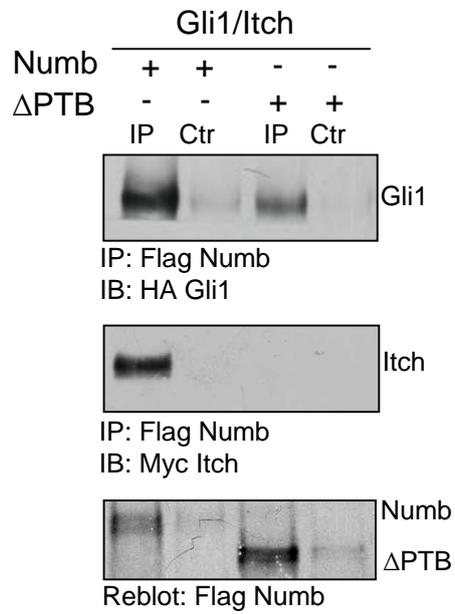


Fig.12 D: Numb recluta Gli1 in un complesso con Itch.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Ha-Gli1 e Myc-Itch in presenza di Flag-Numb wt o Flag-Numb Δ PTB. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-Flag e l'interazione di HA-Gli1 e Myc-Itch con Flag-Numb wt o Flag-Numb Δ PTB viene rivelata rispettivamente con anticorpi anti-HA e anti-Myc.

3.6 Il degrone PPXYs/pSP di Gli1 è richiesto per la regolazione della sua ubiquitinazione da parte di Numb

Per determinare il ruolo funzionale dell'interazione tra Numb e Gli, abbiamo verificato l'effetto dei mutanti di Numb sull'ubiquitinazione di Gli1. Le cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Gli1 WT e con il vettore di espressione per l'ubiquitina in presenza o in assenza di Numb WT o dei mutanti di Numb. In accordo alla sua incapacità di legare Gli1, il mutante di Numb Δ 174-421, che mantiene il sito di legame con Itch, mostra un'attività di ubiquitinazione di Gli1 minore rispetto a Numb WT. Il mutante Numb Δ 85-421, che non è più in grado neanche di legare Itch, è totalmente inattivo nel promuovere l'ubiquitinazione di Gli1 (**Fig.13A**). Questi risultati indicano che il reclutamento di Gli1, mediato da Numb, all'interno del complesso con Itch contribuisce a favorire l'ubiquitinazione di Gli1.

Per verificare se il nuovo degrone che è stato identificato, PPXYs/pSP, è essenziale anche per l'attività di Numb sono stati effettuati altri saggi di ubiquitinazione in vivo in cui cellule HEK293 sono state trasfettate con Gli1 WT o Gli1 TM e con il vettore di espressione per l'ubiquitina in presenza o in assenza di Numb WT o di Numb Δ P_{TM}B. Numb WT è incapace di promuovere l'ubiquitinazione di Gli1 TM, mentre favorisce l'ubiquitinazione di Gli1 WT. Numb Δ P_{TM}B, che non lega più Itch, non è più in grado di collaborare con Itch per promuovere l'ubiquitinazione di Gli1 (**Fig.13B**). Questi risultati dimostrano non solo l'attività specifica di Numb ma anche che l'interazione di Itch con il dominio PPXYs/pSP di Gli1 è richiesta per l'azione di Numb. L'insieme di queste osservazioni confermano il fatto che Numb funziona come una proteina adattatrice che, legando sia Itch che Gli1, promuove l'ubiquitinazione di Gli1.

3.7 Il degrone PPXYs/pSP di Gli1 è richiesto per il controllo delle sue proprietà oncogeniche

La perdita di espressione di Numb nel medulloblastoma e la sua attività inibitoria sulla pathway di Hedgehog suggerisce per questa proteina un ruolo di oncosoppressore (Di Marcotullio et al., 2006).

Infatti l'iperattivazione del pathway di Hedgehog è responsabile della tumorigenesi cerebellare e l'aumento di espressione di Gli1 porta a un aumento della proliferazione delle cellule del medulloblastoma (Galvin et al., 2008). Allo scopo di legare la funzione

FIG. 13 A



FIG. 13 B

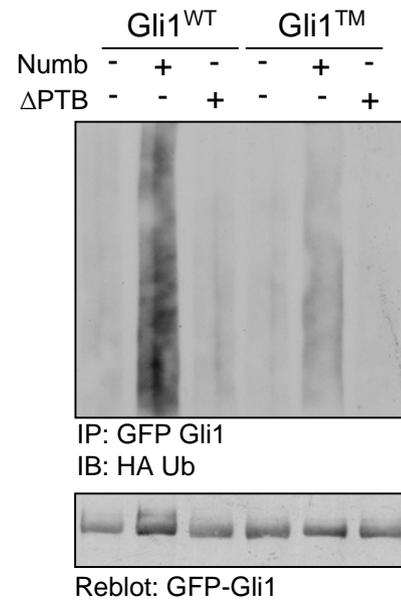


Fig.13 A/B: Il degrone dipendente da Itch è richiesto per l'ubiquitinazione di Gli1 regolata da Numb.

A) Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Gli1 wt e HA-Ub in presenza o in assenza di Flag-Numb wt e i suoi mutanti. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-GFP e tramite un Western blot utilizzando un anticorpo anti-HA è stata rivelata l'ubiquitina coniugata HA. Per confermare l'immunoprecipitazione di Gli1 il filtro è stato ibridato con anticorpo anti-GFP.

B) Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Gli 1 wt o Gli1 TM e HA-Ub in presenza o in assenza di Flag-Numb wt o Flag-Numb Δ PTB. È stato effettuato un saggio di ubiquitinazione come descritto nel punto A.

oncogenica di Gli1 alla pathway di Itch e contemporaneamente determinare il ruolo di Numb è stata analizzata la proliferazione tramite esperimenti di incorporazione della bromodeossiuridina nella linea cellulare di medulloblastoma D283, risultante responsiva al signaling di Hh. Le cellule sono state trafettate con un vettore vuoto, con un vettore di espressione per Gli1 WT o Gli1 TM in presenza o in assenza di Numb WT o Numb Δ PTB. È stato osservato che mentre Gli1 WT favorisce la proliferazione cellulare, questo effetto viene inibito dall'overespressione di Numb, ma non di Numb Δ PTB. Al contrario, l'overespressione di Gli1 TM, aumenta maggiormente il tasso di proliferazione rispetto a Gli1 WT, ma questo tasso non è più influenzato dalla presenza di Numb (**Fig.14A**). Questi risultati indicano che i domini PPXYs e pSP hanno una rilevanza funzionale e mostrano la specificità del ruolo di Itch e Numb nel controllare la crescita tumorale. Per confermare questi dati, sono stati effettuati ulteriori esperimenti che prendono in considerazione la capacità delle cellule tumorali di formare delle colonie in assenza di adesione al substrato. È stato perciò effettuato un test di crescita in soft agar in cui cellule della linea D283 sono state sospese in un mezzo di crescita contenente lo 0.3% di agarosio e piastrate su uno strato di agarosio allo 0.7% nello stesso mezzo di coltura e dopo circa 15 giorni è stato contato il numero di colonie per piastra al fine di caratterizzare la capacità di crescita, ancoraggio-dipendente, tipica delle cellule neoplastiche. Le cellule D283 sono state transfettate con diversi plasmidi di nostro interesse e è stato analizzato il loro effetto in relazione al numero e alla grandezza delle colonie. L'espressione di Gli1 TM, come si evince dal grafico di figura **14B** favorisce la crescita delle cellule D283 al contrario di Gli1 WT. Inoltre, risulta evidente come sia Numb che Itch inibiscono la formazione delle colonie a differenza di Numb Δ PTB e ItchC830A. In linea con i dati precedenti che mettono in evidenza lo specifico ruolo di Numb e Itch sul degrone PPXYs/pSP, Gli1 TM è insensibile a entrambe le proteine (**Fig.14B**).

Inoltre, tramite l'uso di saggi specifici, sono state prese in considerazione altre caratteristiche cellulari che sono collegate allo sviluppo tumorale come la migrazione cellulare e il potenziale di invasione. Cellule di medulloblastoma Daoy, sono state transfettate con Gli1 WT o Gli1 TM e è stata misurata la loro capacità di migrare attraverso una membrana porosa e di invadere una matrice (Matrigel). Le cellule che overesprimono Gli1 TM mostrano un aumento sia della capacità di invasione che di migrazione rispetto alle cellule transfettate con Gli1 WT (**Fig.14C e D**).

In conclusione per validare se la mutazione di Gli1 che coinvolge il motivo PPXYs/pSP ha un'importanza sulla trasformazione cellulare è stato effettuato un saggio di formazione di foci in cellule di rene di ratto (RKE3). In queste cellule

FIG. 14 A

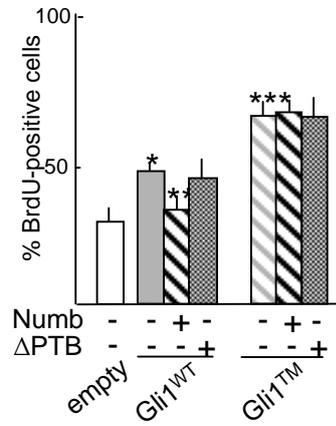


Fig.14 A: Effetto di Gli1 TM sulla proliferazione di cellule di medulloblastoma D283

Saggio di incorporazione della bromodeossiuridina di cellule D283 trasfettate con vettore vuoto, vettori di espressione per Gli1 wt o Gli1 TM in presenza o in assenza di Numb WT o Numb Δ PTB.

FIG. 14 B

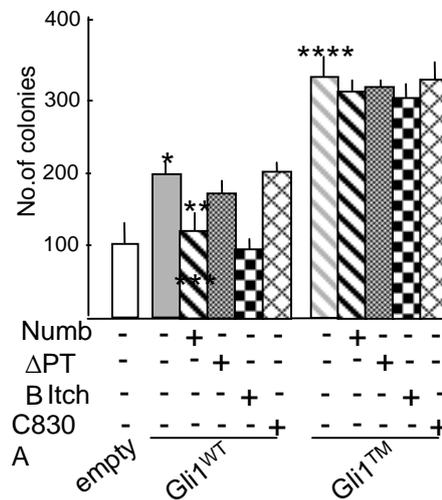


Fig.14 B: Effetto di Gli1 TM sulla crescita cellulare ancoraggio-indipendente di cellule di medulloblastoma D283.

Cellule D283 sono state trasfettate con vettore vuoto, vettori di espressione per Gli1 wt o Gli1 TM in presenza o in assenza dei plasmidi riportati in figura. Il grafico rappresenta il numero di colonie che si sono formate.

FIG. 14 C

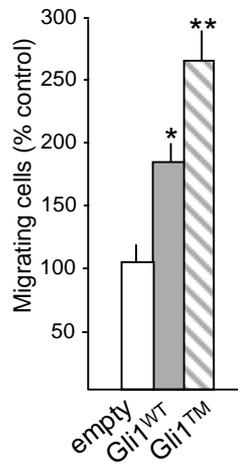


FIG. 14 D

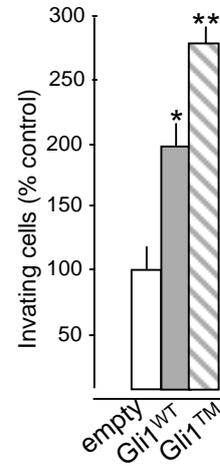


Fig.14 C/D: Effetto di Gli1 TM sulla capacità di migrazione e invasione cellulare
Cellule di medulloblastoma Daoy sono state trasfettate con i plasmidi Gli1 WT o Gli TM e è stata misurata la loro capacità di migrare attraverso una membrana porosa (figura C) e di invadere una matrice (Matrigel) (figura D).

FIG. 14 E

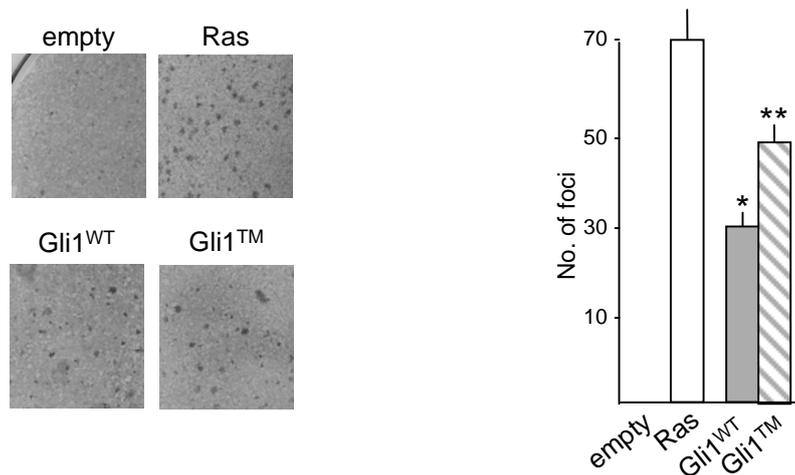


Fig.14 E: Effetto di Gli1 TM sulla capacità proliferativa cellulare mediante un test di formazione di foci

Cellule di rene di ratto (RKE3) sono state trasfettate con un vettore vuoto, i vettori di espressione per l'oncogene Ras, i vettori di espressione per Gli1 WT o Gli TM; dopo tre settimane le cellule vengono fissate, colorate con cristal violetto e misurata la loro capacità di formare foci. Il grafico rappresenta il numero di foci che si sono formati. Il risultato è ricavato dalla media di tre esperimenti indipendenti, ognuno effettuato in doppio.

l'overespressione di Gli1 o di un noto oncogene come Ras induce la formazione di foci (**Fig.14E**) (Ruppert et al., 1991; Canettieri et al., 2010). Come riportato in figura **14E** l'overespressione di Gli1 TM aumenta la formazione di foci rispetto l'overespressione di Gli1 WT. Questi risultati dimostrano che alterazioni di Gli1 nella degran Itch-dipendente favoriscono la capacità oncogenica di Gli1, almeno in vitro, e mettono in evidenza l'importanza di Itch e Numb nella repressione della pathway di Hedgehog.

4. DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato identificato un nuovo meccanismo molecolare di regolazione dell'HECT ligasi Itch, indotto da Numb, nel promuovere l'ubiquitinazione di Gli1.

La proteina Itch assume una conformazione inattiva ripiegata su se stessa quando il dominio catalitico C-terminale lega la regione N-terminale, comprendente i domini PRR (regione ricca in proline) e la regione WW.

È stato dimostrato come Numb, nel legare la regione WW2 di Itch, disloca il dominio HECT dall'interazione con la regione WW. In questo modo Itch subisce un cambiamento conformazionale diventando una proteina cataliticamente attiva (**Fig.15**). Questo cambiamento conformazionale può essere anche indotto dalla fosforilazione di alcuni siti ricchi in prolina nella regione WW di Itch da parte ad esempio della chinasi JNK1 (Gallagher et al., 2006). Altri studi supportano il concetto generale che Itch e altre E3-ligasi, sono attivate, oltre da eventi di fosforilazione, anche dall'interazione con molecole adattatrici che alterano la loro conformazione auto-inibitoria. Ad esempio la "proteina adattatore" NDFIP1 lega tre dei quattro domini WW di Itch attraverso i suoi domini PY, causando la rottura delle interazioni intramolecolari di Itch e favorendo così la sua attivazione (Mund and Pelham, 2009).

Nel nostro caso Numb, nell'attivare Itch, provoca l'apertura della sua struttura proteica, favorisce l'entrata di Gli1 nel complesso e la sua successiva ubiquitinazione. Inoltre Numb stesso interagisce direttamente con Gli1. Si viene così a creare un complesso costituito da queste tre proteine (Gli1/Numb/Itch). L'interazione tra Gli1 e Itch è necessaria per l'ubiquitinazione di Gli1: coinvolge il legame della regione WW di Itch (WW1, -2, -4) con i siti PPXYs e pSP della regione C-terminale di Gli1. La mutazione dei due siti PPXY e del sito pSP (Gli1TM) impedisce l'ubiquitinazione di Gli1 da parte di Itch. È stato già dimostrato che i motivi PPXY sono importanti nel mediare l'ubiquitinazione di Itch sui suoi substrati (Omerovic et al., 2007; Shembade et al., 2008). I nostri risultati mettono per la prima volta in evidenza anche il coinvolgimento del modulo pSP e la sua importanza funzionale. L'abilità di Itch di interagire attraverso i WW ricorda un meccanismo degradativo di NEDD4, un'altra HECT-ligasi, che attraverso i suoi domini WW interagisce con motivi PPXY e pSP (Bedford et al., 2000).

I nostri dati aggiungono un'ulteriore complessità alla regolazione di Gli1 attraverso meccanismi ubiquitina-dipendenti. È stato dimostrato come β -TrCP, un' E3-ligasi del

FIG. 15

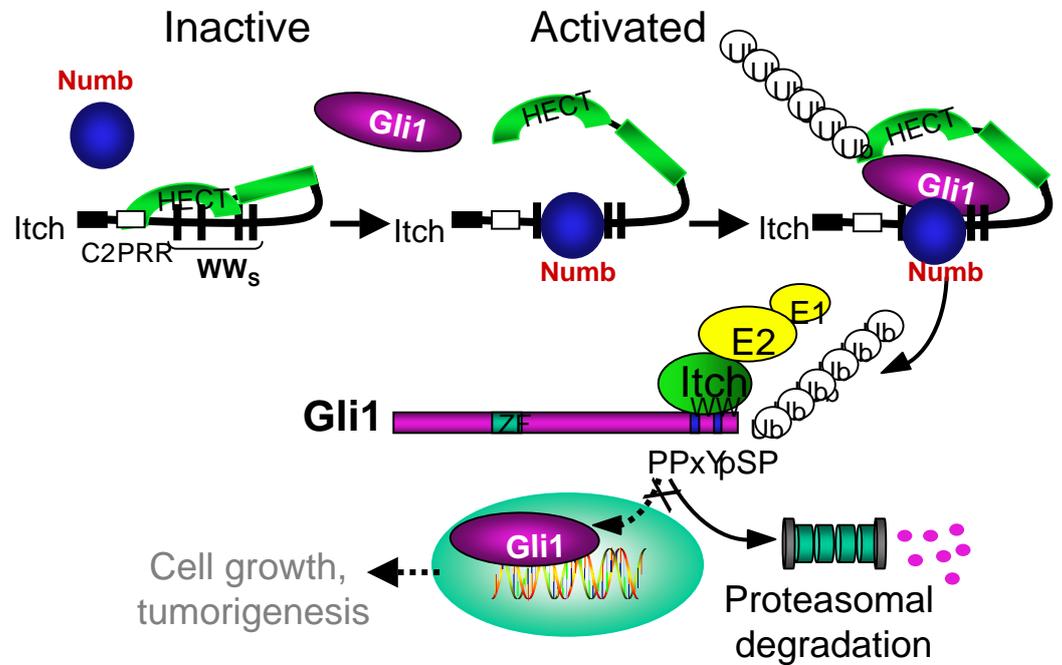


Fig.15 : Numb attiva Itch e recluta Gli1 in un complesso con Itch, promuovendo la sua ubiquitinazione e degradazione.

Numb lega i WW di Itch, provocando la rottura delle interazioni intramolecolari di Itch tra il dominio HECT e i domini WW, favorisce il reclutamento della proteina Gli1. I WW di Itch legano i domini PPXYs e pSp nella regione C-terminale di Gli1. Gli1 viene ubiquitinato e degradato dal proteosoma 26S. Questo processo ostacola l'attività oncogenica di Gli1.

complesso SCF (SKP1-Cullina1- β -TrCP), promuove l'ubiquitinazione di Gli1 e la sua successiva degradazione contrastando l'attivazione del signaling di Hedgehog. La downregolazione delle Cullina1 attraverso l'attivazione della pathway di Hh, mantiene bassi i livelli di degradazione di Gli1 (Huntzicker et al., 2006). Al contrario l'up-regolazione della proteina adattatore HIB/SPOP, indotta sempre dall'attivazione della pathway di Hh, promuove l'attivazione della Cullina3 e l'ubiquitinazione di Gli1. Questo costituisce un meccanismo di auto-regolazione attraverso cui Hh modula negativamente la risposta da esso indotta (Zhang et al., 2006).

In questo lavoro è stato descritto un nuovo meccanismo di ubiquitinazione di Gli1 mediato da Itch e promosso dalla proteina Numb. È stato proprio messo in risalto il ruolo di Numb, che nell'attivare Itch, contrasta il signaling di Hh. Numb svolge un ruolo importante nel determinare la divisione cellulare asimmetrica controllando il destino cellulare (Gulino et al., 2010). L'abilità di Numb nel controllare oncogeni, come Notch, un altro substrato di Itch, e soppressori tumorali come p53, suggerisce un forte collegamento tra la deregolazione delle funzioni di Numb e lo sviluppo tumorale. A tal riguardo, è stata descritta un'iperattivazione di Notch in molte forme tumorali (Talora et al., 2008).

Anche nel nostro laboratorio è stato evidenziato il ruolo di Numb in processi tumorigenici. Abbiamo osservato, infatti, che l'espressione di Numb è downregolata nei medulloblastomi umani e murini, ed è in grado di promuovere il differenziamento e l'arresto della crescita delle cellule tumorali. Numb riesce a fare ciò proprio grazie alla sua capacità di sopprimere l'attività funzionale di Gli1 attraverso la promozione della sua ubiquitinazione (Di Marcotullio et al., 2006). La ridotta ubiquitinazione di Gli1, causante un accumulo della proteina stessa in cellule di medulloblastoma, ha indotto ad analizzare meglio i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione di questo fattore di trascrizione.

Abbiamo ipotizzato un modello in base al quale alterazioni di Gli1 nella degranazione Itch-dipendente, favoriscono la capacità oncogenica di Gli1. Infatti mutazioni dei due siti PPXY e del sito pSP di Gli1 oltre a impedire l'ubiquitinazione da parte di Itch determinano un aumento della stabilità di Gli1, della sua abilità di promuovere la crescita di linee cellulari di MB, la crescita tumorale ancoraggio-indipendente e l'alta capacità di migrazione e invasione delle cellule di MB. Inoltre l'espressione di Gli1 TM aumenta in vitro la trasformazione neoplastica di cellule di rene di ratto (RK3E). Per queste ragioni, terapie che prevengono un accumulo della proteina Gli1 potrebbero avere proprietà anti-tumorali.

Oltre a Gli1, Itch è coinvolto nella regolazione di altri target proteici coinvolti nella tumorigenesi come Jun, p73, p63 (Bernassola et al., 2008; Melino et al., 2008). Questo suggerisce un possibile ruolo di Itch in processi tumorali. Tuttavia in casi umani di deficienza di Itch e nei topi mutati per Itch non è stata segnalata la comparsa di tumori spontanei (Perry et al., 1998; Lohr et al., 2010). Inoltre non sono stati effettuati studi che correlano la deplezione di Itch con lo sviluppo di tumori. Non è chiaro così il ruolo di Itch nella tumorigenesi e sono necessari ulteriori studi. È di fondamentale importanza ricordare però, che i topi mutati per Itch non ci consentono di capire bene se si riscontrano forme tumorali per la loro vita media troppo breve a causa di difetti al sistema immunitario e infiammatori. Per questo motivo è importante analizzare diversi backgrounds genetici. Ad esempio, considerando che molte proteine target di Itch sono implicate in processi tumorali, e che lo sviluppo di un tumore dipende dalla somma di più fattori, sarebbe opportuno studiare in futuro l'effetto di mutanti condizionali di Itch in modelli di medulloblastoma *Ptc1^{+/-}*.

5. RISULTATI

SECONDA PARTE

Ruolo di Ren^{KCTD11}, una nuova E3-ligasi come antagonista della pathway di Hedgehog.

In questo lavoro mi sono proposta di studiare i meccanismi di degradazione ubiquitina-dipendenti coinvolti nel signaling di Hedgehog indotti da una nuova E3-ligasi, identificata nel nostro laboratorio, REN^{KCTD11} / Cul3, appartenente alla famiglia delle RING E3s. Il gene REN^{KCTD11}, mappa sul cromosoma 17p, e risulta deleto nel 40% dei medulloblastomi sporadici fino ad ora analizzati (Di Marcotullio et al., 2004). Nei nostri precedenti lavori abbiamo dimostrato come REN è in grado di sopprimere la crescita di cellule di medulloblastoma attraverso la riduzione dell'attività trascrizionale di Gli1, (Di Marcotullio et al., 2004) e come la sua espressione promuove l'arresto della crescita e il differenziamento dei progenitori cerebellari dei granuli (GCPs) e in cellule di medulloblastoma (Argenti et al., 2005). Abbiamo così voluto identificare la funzione di REN e caratterizzare i meccanismi molecolari attraverso cui REN regola la pathway di Hedgehog.

5.1 REN è una nuova Cul3 E3 Ubiquitina-Ligasi

Le proteine contenenti un dominio BTB/POZ fanno parte di una grande famiglia, alla quale appartengono adattatori capaci di interagire, proprio attraverso la regione BTB/POZ, con la Cullina 3 (Cul3), un componente del complesso SCF-like in grado di promuovere l'ubiquitinazione e la degradazione proteolitica di specifici substrati (Pintard et al., 2004). Partendo dalla conoscenza che la proteina REN, presenta nella porzione N-terminale un dominio BTB/POZ, si è ipotizzato che REN fosse capace di interagire con Cul3. Per verificare questa ipotesi, sono stati condotti esperimenti di co-immunoprecipitazione (CO-IP). A tal proposito cellule della linea HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione codificanti per Cul3, REN ed un suo mutante deleto del dominio BTB/POZ. I risultati di questi saggi hanno evidenziato

un'interazione molecolare tra REN e Cul3 (**Fig.16A**), ed inoltre hanno dimostrato che tale legame avviene tramite il dominio BTB/POZ, dal momento che il mutante delecto di questa regione fallisce nell'interazione con Cul3. Per validare ulteriormente questo dato, si è voluto verificare se REN fosse capace di interagire anche con Cul3 endogeno. A tal proposito cellule della linea HEK293 sono state trasfettate solo con vettori di espressione per REN e ΔBTB. Il lisato proteico è stato sottoposto ad immunoprecipitazione seguita da Western Blott realizzati con anticorpi che riconoscessero Cul3 endogeno. Questi esperimenti hanno confermato che la proteina wild-type, a differenza del mutante di REN ΔBTB/POZ, è in grado di interagire con Cul3 endogeno (**Fig.16B**). Questi dati hanno confermato la specificità di legame tra REN e Cul3 e, in particolare, che il dominio BTB/POZ risulta necessario e specifico per questa interazione.

In base a degli studi di modellistica molecolare abbiamo identificato i possibili residui aminoacidici di REN e Cul3 responsabili della loro interazione (**Fig.16C**). Per validare questi studi, sono stati generati dei mutanti di REN (REN FY, F103K, Y104K) e Cul3 (Cul3 mut, Y58/62/125K), attraverso la sostituzione dei singoli residui amonoacidici mediante l'uso di kit commerciali specifici per la mutagenesi. Esperimenti di co-immunoprecipitazione (CO-IP), hanno rivelato, come mostrato in figura **16D**, che Cul3 è in grado di legare REN WT, ma non il suo mutante REN FY, in cui sia fenilalana 103 che la tirosina 104 sono state sostituite con una lisina. REN WT, invece, non è più in grado di legare il mutante di Cul3 (Y58/62/125K), in cui le tirosine 58, 62, 125 sono state sostituite con le lisine (**Fig.16E**).

La famiglia delle Culline, oltre che da Cul3, risulta costituita anche da altri membri: i più conosciuti sono la Cullina1 (Cul1) e la Cullina2 (Cul2).

Validata l'ipotesi che REN lega Cul3, abbiamo verificato se REN, data l'omologia di sequenza del suo BTB/POZ con quello di Skp1 ed elonginaC (rispettivamente proteine "adattatori" di Cul1 e Cul2), fosse in grado di legare anche le altre culline. A questo proposito cellule HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione codificanti per REN in presenza di vettori di espressione per Cul1, Cul2 o Cul3. Saggi di immunoprecipitazione hanno non solo confermato l'interazione tra REN e Cul3, ma hanno confermato che questa interazione è esclusiva, dal momento che REN non è in grado di legare le altre culline in esame, come si evince dalla figura **16F**.

Queste evidenze sperimentali hanno indotto a focalizzare la nostra attenzione sull'interazione specifica tra REN e Cul3 e sulle possibili conseguenze funzionali a cui la formazione di questo complesso può portare. Come già ricordato, infatti, la Cullina3 è un componente del complesso SCF-like in grado di promuovere l'ubiquitinazione e la

FIG. 16 A

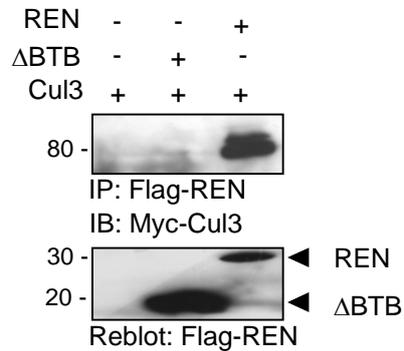


Fig.16 A: CUL3 si associa a REN ma non al suo mutante Δ BTB. Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Myc-Cul3 e con Flag-REN o con Flag- Δ BTB. Dopo 24h di trasfezione, le cellule sono state lisate ed il lisato è stato sottoposto ad immunoprecipitazione tramite uso di anti-Flag agarose. Gli immunocomplessi sono stati rivelati con anticorpo anti-Myc. L'immunoprecipitazione di REN è stata confermata tramite ibridazione con anticorpo anti-Flag

FIG. 16 B

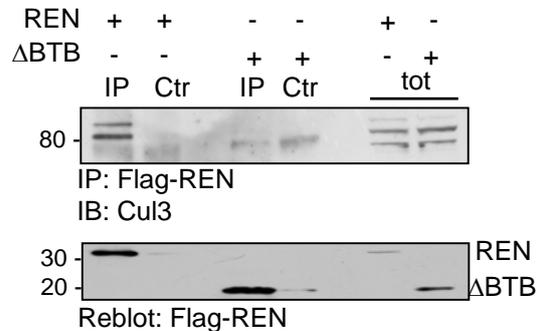


Fig. 16 B: REN, ma non il suo mutante Δ BTB, interagisce con Cul3 endogeno. Cellule HEK293 sono state trasfettate con Flag-REN o con Flag- Δ BTB. L'immunoprecipitazione è stata realizzata con anticorpo anti-Flag agarose. Nei campioni di controllo negativo l'anticorpo è stato saturato con 0.1mg/ml peptide anti-Flag prima dell'IP. L'immunocomplesso è stato rivelato con anticorpo anti-Cul3 rabbit. L'immunoprecipitazione di REN è stata confermata tramite ibridazione con anticorpo anti-Flag.

FIG. 16 C

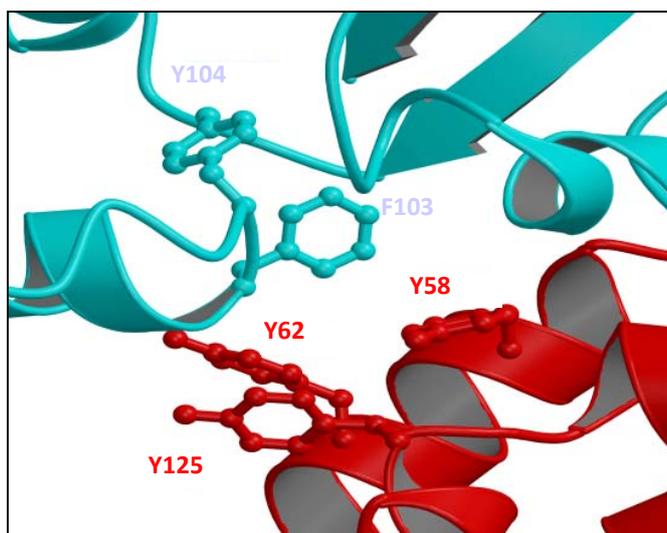
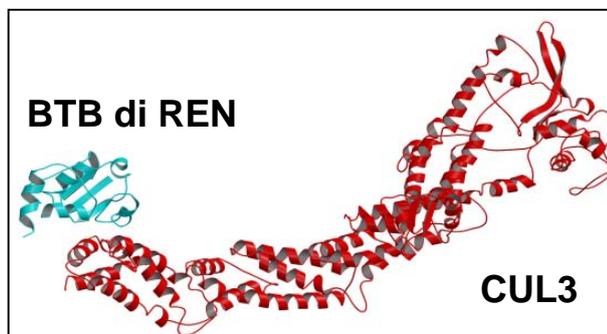


Fig.16 C: Struttura 3-D del dominio BTB di REN

Sono rappresentati in figura i residui di REN e Cul 3 coinvolti nella formazione del legame.

FIG. 16 D

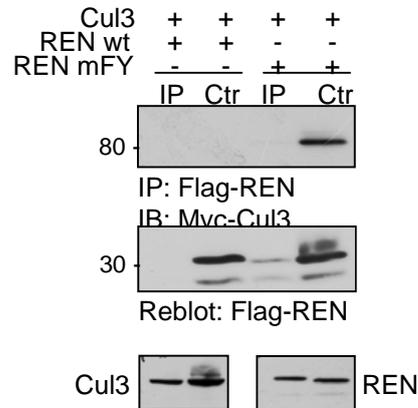


Fig.16 D: CUL3 si associa a REN ma non al suo mutante REN FY. Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Myc-Cul3 e con Flag-REN o con Flag-REN FY (F103K, Y104K). Dopo 24h di trasfezione, le cellule sono state lisate ed il lisato è stato sottoposto ad immunoprecipitazione tramite uso di anti-Flag agarose. Gli immunocomplessi sono stati rivelati con anticorpo anti-Myc. L'immunoprecipitazione di REN è stata confermata tramite ibridazione con anticorpo anti-Flag.

FIG. 16 E

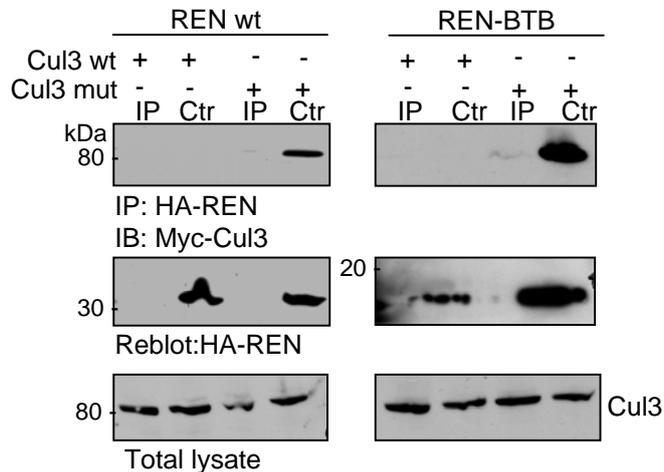


Fig.16 E: REN si associa a CUL3 wt, ma non al suo mutante Cul3 mut.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con HA-REN o HA-REN BTB e con Myc-Cul3 wt o Myc-Cul3 mut(Y58/62/125K). Dopo 24h di trasfezione, le cellule sono state lisate ed il lisato è stato sottoposto ad immunoprecipitazione tramite uso di anti-HA agarose. Gli immunocomplessi sono stati rivelati con anticorpo anti-Myc. L'immunoprecipitazione di REN è stata confermata tramite ibridazione con anticorpo anti-HA.

degradazione proteolitica di specifici substrati. L'evidenza che REN sia in grado di interagire fisicamente con Cul3 ne ha suggerito la possibile funzione come "proteina adattatore", capace di promuovere l'ubiquitinazione, Cul3-dipendente, di proteine substrato, identificando così nel complesso REN-Cul3, una nuova E3 Ubiquitina-ligasi. Al fine di verificare se la formazione del complesso REN-Cul3 potesse essere associata alla realizzazione di processi di ubiquitinazione e se, quindi, questa interazione potesse avere anche un significato funzionale, sono stati realizzati saggi di ubiquitinazione in vitro. Cellule della linea HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione codificanti per HA-REN e HA-REN Δ BTB e dopo 24 ore il lisato proteico è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-HA. Successivamente, negli immunocomplessi sono state aggiunte le proteine ricombinanti necessarie per ricostruire in vitro il complesso di ubiquitinazione: Flag-Ub, E1 ed E2, ATP ed enzimi necessari per bloccare il processo di deubiquitinazione. Dopo incubazione a 30 °C, per il tempo indicato in figura, i campioni sono stati analizzati tramite Western blot e l'effetto di ubiquitinazione è stato valutato con un anticorpo anti-Flag specifico per l'Ub. Come si evince dalla figura **16G**, la presenza di REN determina l'attivazione di processi di ubiquitinazione; al contrario questo non avviene nei campioni che esprimono il mutante REN Δ BTB. Questo esperimento attesta che REN è in grado di svolgere azione di E3 ubiquitina-ligasi, e che la mancanza del dominio BTB, necessario per l'interazione di REN con Cul3, determina la perdita di questa sua capacità funzionale.

5.2 REN/Cul3 E3-ligasi lega, ubiquitina e degrada

HDAC1

Dopo aver verificato la capacità del complesso REN/Cul3 di svolgere un'azione ubiquitina-ligasica, il passo successivo è stato quello di determinare quali potessero essere i possibili substrati di questa nuova E3-ligasi. La nostra attenzione si è focalizzata in primo luogo sulle proteine istone-deacetilasi (HDACs) che, come noto, sono regolatori trascrizionali critici nello sviluppo cellulare e nella tumorigenesi. Recentemente nel nostro laboratorio è stata identificata, infatti, la possibile funzione delle HDAC di classe I come regolatori del signaling di Hedgehog. Evidenze sperimentali, prodotte dai nostri colleghi, hanno dimostrato che, in particolare, HDAC1 si comporta come un potente attivatore del signaling Hedgehog-Gli, determinando, un

FIG. 16 F

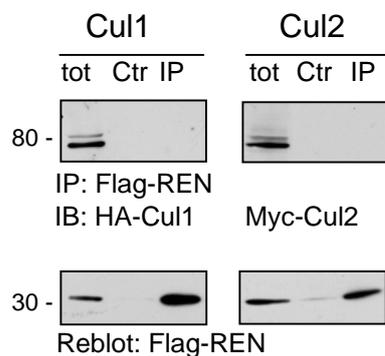


Fig.16 F: REN interagisce con Cul3, ma non Cul1 e Cul2.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con Flag-REN e con Myc-Cul3, o con HA-Cul2 o con HA-Cul1. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anti-Flag agarose, saturato nei campioni di controllo negativo con 0.1mg/ml peptide anti-Flag. Gli immunocomplessi sono stati rivelati con anticorpi anti-Myc per Cul3 o anti-HA per Cul1 e Cul2. L'immunoprecipitazione di REN è stata confermata tramite ibridazione con anticorpo anti-Flag.

FIG. 16 G

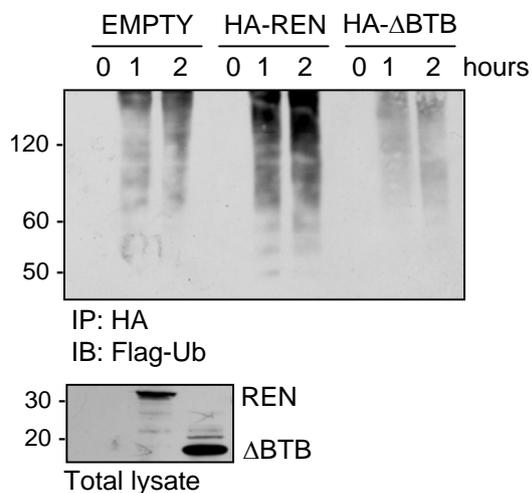


Fig.16 G: REN e Cul3 formano un complesso SCF-like E3 ubiquitina-ligasi.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione per HA-REN e HA-ΔBTB e successivamente trattate con MG132 per 6 ore prima della lisi. L'immunoprecipitazione è stata realizzata con anticorpo anti-HA agarose e successivamente l'immunocomplesso è stato sottoposto ad un saggio di ubiquitinazione in vitro e quindi rivelato con anticorpo anti-Flag.

incremento dell'attività trascrizionale Gli1-dipendente (Canettieri et al., 2010). Il nostro obiettivo, in questo contesto, è stato quello di verificare se HDAC1 potesse essere regolato negativamente dal complesso REN/Cul3. L'ipotesi da noi formulata è che REN, precedentemente identificato come antagonista di Gli1, sia in grado di promuovere l'ubiquitinazione e successiva degradazione di HDAC1, inibendone così la funzione di attivatore di Gli1. La prima evidenza a sostegno della nostra ipotesi, proviene da esperimenti di CO-IP, nei quali è stata verificata l'appartenenza di HDAC1 al complesso REN/Cul3.

Cellule della linea HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione per Flag-REN, Flag-REN Δ BTB, o Flag-RENBTB in presenza di HA-HDAC1 e Myc-Cul3. Dopo 24 ore dalla trasfezione il lisato cellulare è stato immunoprecipitato per REN utilizzando un anticorpo anti-Flag. L'immunocomplesso è stato poi rivelato mediante Western Blot con anticorpi anti-Myc o anti-HA allo scopo di rilevare il legame rispettivamente con Cul3 ed HDAC1. Come si può osservare in figura **17A** REN è in grado di interagire con entrambe le proteine in esame, il mutante REN Δ BTB interagisce solo con HDAC1, mentre RENBTB solo con Cul 3. Questo risultato pone in evidenza la presenza di due distinti domini di REN: una regione N-terminale che, come dimostrato, risulta essenziale per l'interazione con Cul3, ed una regione C-terminale coinvolta nel riconoscimento e nell'interazione con il substrato (**Fig.17A**).

Con lo scopo di comprendere se il legame di HDAC1 con il complesso REN/Cul3 sia dipendente o meno dalla presenza di REN, sono state co-trasfettate cellule della linea HEK293 con la stessa metodica utilizzata per stabilire l'appartenenza di HDAC1 al complesso multiproteico REN/Cul3. In questo caso, però, sono stati utilizzati solo vettori di espressione per HDAC1 e Cul3 in presenza o in assenza di REN. I lisati proteici sono stati poi immunoprecipitati per HDAC1 ed analizzati mediante Western blot. Questo esperimento ha supportato l'evidenza che la capacità di HDAC1 di appartenere al complesso REN-Cul3 dipende dalla sua interazione specifica con REN. Infatti, come si può osservare in figura **17B**, HDAC1 non è capace di legare Cul3 in assenza di REN. REN fungerebbe, così, da "proteina adattatore" responsabile del riconoscimento del substrato, in questo caso di HDAC1 (**Fig.17B**). In seguito alla verifica delle interazioni molecolari che intercorrono tra HDAC1 ed il complesso REN/Cul3, si è proceduto con il proposito di stabilire se REN fosse in grado di promuovere l'ubiquitinazione di HDAC1. A tale scopo sono stati condotti saggi di ubiquitinazione in vitro. HDAC1, in vitro traslato e marcato radiattivamente (35 S-HDAC) è stato incubato in presenza o in assenza di REN e le proteine ricombinanti necessarie per ricostruire in vitro il complesso di ubiquitinazione; dopo

FIG. 17 A

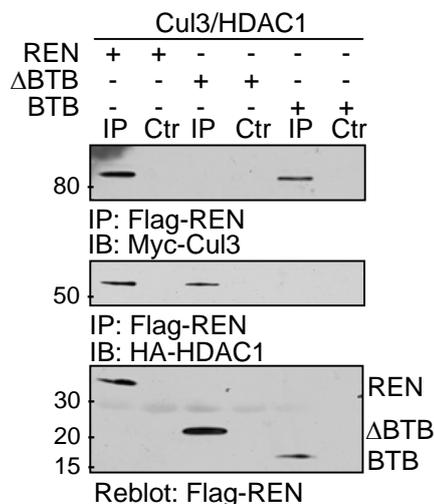


Fig.17 A: REN forma un complesso con Cul3 e HDAC1

Cellule della linea HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione per Flag-REN, Flag-REN Δ BTB, o Flag-RENBTB in presenza di HA-HDAC1 e Myc-Cul3. Dopo 24 ore dalla trasfezione il lisato cellulare è stato immunoprecipitato per REN utilizzando un anticorpo anti-Flag. L'immunocomplesso è stato poi rivelato mediante Western Blot con anticorpi anti-Myc o anti-HA allo scopo di rilevare il legame rispettivamente con Cul3 ed HDAC1.

FIG. 17 B

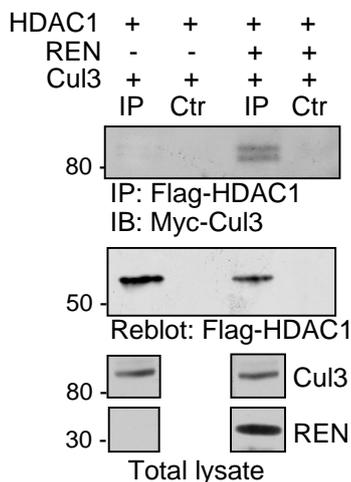


Fig.17 B: HDAC1 forma un complesso con Cul3 solo in presenza di REN.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione per Flag-HDAC1 e per HA-REN o per Myc-Cul3. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anti-Flag agarose, saturato con 0.1mg/ml peptide anti-Flag nei campioni di controllo negativo. Gli immunocomplessi sono stati rivelati con anticorpi anti-Myc per Cul3. L'immunoprecipitazione di HDAC1 è stata confermata tramite ibridazione con anticorpo anti-Flag.

incubazione a 30°C, per il tempo indicato in figura, l'ubiquitinazione di HDAC1 è stata rilevata mediante SDS-PAGE e fluorografia. Come si può vedere dalla figura **17C** dopo una reazione di 30 minuti in presenza di REN, HDAC1 viene efficientemente ubiquitinato (**Fig.17C**). L'ubiquitinazione di HDAC1 è stata anche confermata in vivo. Cellule della linea HEK293 sono state trasfettate con vettori di espressione codificanti per l'ubiquitina (HA-Ub), Flag-HDAC1 in combinazione con vettori di espressione per HA-REN o per il suo mutante HA- Δ BTB (da soli o in combinazione con Myc-Cul3). L'immunoprecipitazione è stata realizzata con anticorpo anti-Flag per HDAC1. Il Western Blot, realizzato con anticorpo anti-HA per l'Ub, ha rivelato un aumento dell'ubiquitinazione nei campioni co-trasfettati con vettori di espressione codificanti per REN e per Cul3, (**Fig.17D**) mentre nei campioni co-trasfettati con il vettore di espressione codificante per REN- Δ BTB, sia in presenza che in assenza di Cul3, si osserva una significativa riduzione del processo di ubiquitinazione (**Fig.17D**). A supporto di questo dato sono stati condotti ulteriori saggi di ubiquitinazione in vivo a carico di HDAC1 endogeno. A questo scopo, sono state trasfettate cellule HEK293 con vettori di espressione per l'ubiquitina (HA-Ub), e rispettivamente per REN e per Δ BTB. Il lisato proteico è stato poi immunoprecipitato con un anticorpo specifico per HDAC1 endogeno. Il Western blot realizzato con anticorpo anti-HA per l'ubiquitina, ha rivelato un aumento dell'ubiquitinazione nei campioni trasfettati con REN rispetto a quelli trasfettati con il suo mutante Δ BTB. Questo esperimento, dunque, ha confermato che il dominio BTB/POZ di REN è fondamentale ai fini dell'ubiquitinazione del substrato, HDAC1. La delezione del dominio BTB, coinvolto nel legame con Cul3, infatti, riduce l'ubiquitinazione di HDAC1; indicando come, ai fini del processo, sia necessario un complesso Cul3/REN integro (**Fig.17E**). L'ubiquitinazione di HDAC1, indotta da REN, ha suggerito che la proteina ubiquitinata potesse andare incontro ad un processo di degradazione mediata dal proteosoma. L'overespressione di REN è risultata, infatti, capace di ridurre significativamente i livelli proteici di HDAC1 esogeno, con una modalità dose-dipendente (**Fig.17F**). Questo effetto sembra essere revertito, invece, dal trattamento con l'inibitore del proteosoma MG132, che porta alla stabilizzazione dei livelli proteici di HDAC1 anche quando REN è overespresso (**Fig.17G**).

FIG. 17 C

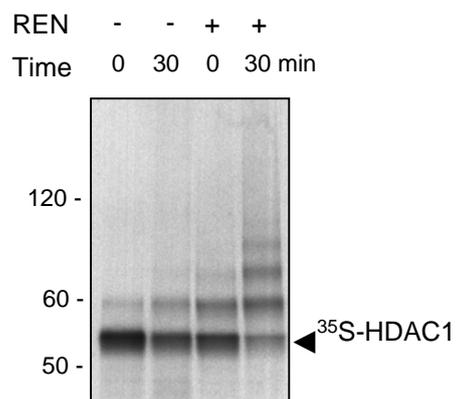
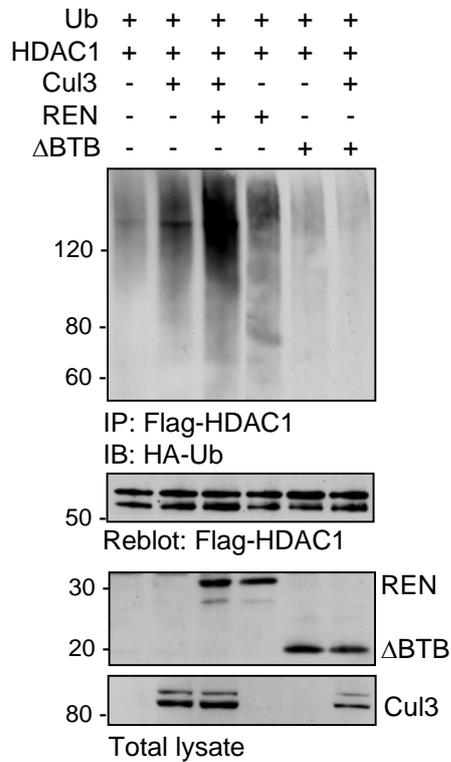
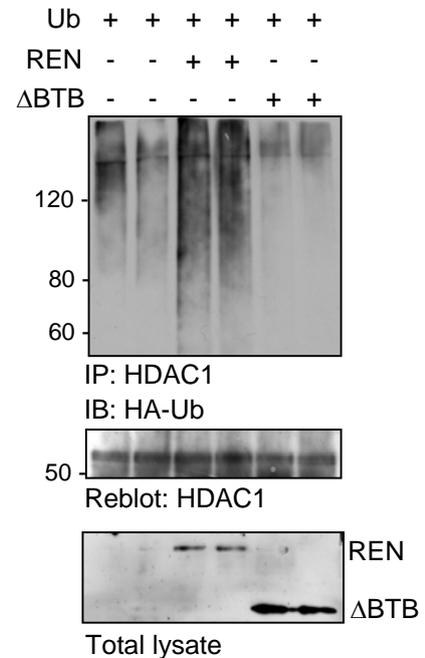


Fig.17 C: REN ubiquitina HDAC1 in vitro

HDAC1, in vitro traslato e marcato radiattivamente (³⁵S-HDAC) è stato incubato in presenza o in assenza di REN e le proteine ricombinanti necessarie per ricostruire in vitro il complesso di ubiquitinazione; dopo incubazione a 30°C, per il tempo indicato in figura, l'ubiquitinazione di HDAC1 è stata rilevata mediante SDS-PAGE e fluorografia.

FIG. 17 D**FIG. 17 E****Fig.17****D) Il complesso REN/Cul3 induce l'ubiquitinazione di HDAC1.**

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione per HA-Ubiquitina, HA-REN e HA-ΔBTB, Myc-Cul3 e per Flag-HDAC1. Prima della lisi sono state trattate con MG132 ed il lisato cellulare è stato poi immunoprecipitato con anti-Flag agarose. Tramite Western-blot con anticorpo anti-HA si è rivelata la proteina Ub coniugata HA. L'ubiquitinazione di HDAC1 risulta aumentata nei campioni cotrasfettati con REN e Cul3 ma non in quelli trasfettati con il mutante ΔBTB.

E) REN induce l'ubiquitinazione di HDAC1 endogeno.

Cellule HEK293 sono state cotrasfettate con vettori di espressione per HA-Ubiquitina, Flag-REN e Flag-ΔBTB e successivamente trattate con MG132 prima della lisi. HDAC1 è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-HDAC1 rabbit. Il Western blot è stato realizzato con anticorpo anti-HA per rilevare l'Ub coniugata ad HA.

FIG. 17 F

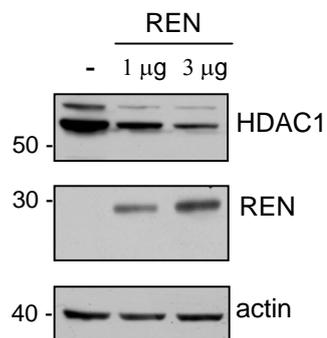


Fig.17 F: L'over-espressione di REN riduce i livelli proteici di HDAC1 con modalità dosedipendente.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con HA-HDAC1, da solo o in presenza di dosi crescenti di Flag-REN. Un'uguale quantità di lisato cellulare è stata sottoposta a Western blot usando anticorpi anti-HA, anti-Flag o anti-actina (come controllo).

FIG. 17 G

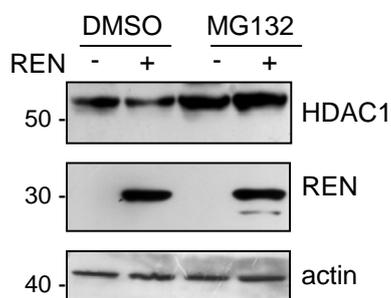


Fig.17 G: I livelli proteici di HDAC1 sono stabilizzati dall'inibitore del proteosoma MG132.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con HA-HDAC1, in presenza o in assenza di Flag-REN e, trattate o meno con MG132. Un'uguale quantità di lisato cellulare è stata sottoposta a Western blot usando anticorpi anti-HA, anti-Flag o anti-actina (come controllo).

5.3 REN regola negativamente l'attività di HDAC1

Come accennato precedentemente, esperimenti condotti nel nostro laboratorio, hanno messo in evidenza la funzione di HDAC1 come regolatore positivo del signaling di Hh. HDAC1 sembra, infatti, promuovere l'attivazione di Gli1. Inoltre esperimenti di siRNA, mirati ad abrogare i livelli endogeni di HDAC1, hanno mostrato una significativa riduzione dell'espressione dell'mRNA di Gli1 (**Fig.18A**), ponendo in stretta relazione la perdita della funzione di HDAC1 con una deregolazione della pathway di Hedgehog. D'altra parte, i dati fino ad ora riportati, hanno individuato in REN/Cul3 una nuova E3-ligasi in grado di ubiquitinare HDAC1 determinandone la degradazione. Sulla base di queste importanti evidenze sperimentali, si è voluto indagare sulla possibilità che REN potesse essere capace di inibire la funzione di Gli1 attraverso la regolazione negativa condotta sull'attività di HDAC1.

A tal fine, tramite saggio luciferasico, è stata valutato l'effetto che REN e/o HDAC1 possono avere sull'attività trascrizionale di Gli1 ectopico. Cellule HEK293 sono state quindi trasfettate con il Gli-reporter luciferasico (12xGli-Luc) contenente 12 siti ripetuti (TGGGTGGTC) responsivi a Gli, posti a monte del gene codificante per la luciferasi. Insieme al reporter sono stati trasfettati vettori di espressione codificanti per REN (con modalità dose-crescente) e per HDAC1.

Come si evince dalla figura **18B** l'attività trascrizionale di Gli1 risulta fortemente aumentata in presenza di HDAC1, mentre si riduce progressivamente in presenza di dosi crescenti di REN sia in assenza, ma soprattutto e più significativamente in presenza di HDAC1. Abbiamo voluto verificare, inoltre, che il mutante di REN, delecto del domino BTB, non avesse alcun effetto sull'attività trascrizionale mediata da Gli1. Sono stati quindi condotti ulteriori saggi di luciferasi trasfettando cellule HEK293 con il 12xGli-Luc (come descritto sopra), insieme al quale sono stati trasfettati vettori di espressione per REN, per HDAC1 e per REN Δ BTB.

Il saggio mostra che il mutante di REN risulta incapace di ridurre l'attività trascrizionale di Gli1, a differenza di quello che si osserva per la proteina wild type (**Fig.18C**).

In ultima analisi si è voluto verificare se HDAC1 fosse necessario per mediare l'inibizione REN-dipendente della funzione di Gli1. Per raggiungere tale scopo cellule della linea MEF Ptc1-/- (in cui l'abrogazione dell'espressione del recettore inibitore Ptc determina l'attivazione costitutiva del signaling di Hh) sono state co-trasfettate con REN ed un reporter luciferasico per Gli e sottoposte alternativamente a trattamenti con un farmaco che agisce da potente inibitore delle deacetilasi istoniche noto come

FIG. 18 A

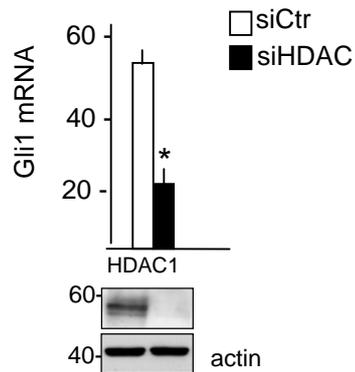


Fig.18 A L'abrogazione dei livelli endogeni di HDAC1 riduce l'espressione dell'mRNA di Gli1.

Cellule NIH3T3 sono state trasfettate con siRNA per HDAC1. I livelli di mRNA di Gli1 sono stati valutati tramite Q-PCR. Il pannello in basso mostra i livelli proteici di HDAC1 dopo trasfezione del siRNA.

FIG. 18 B

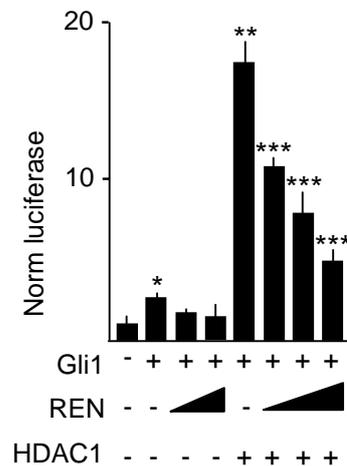


Fig.18 B: REN inibisce l'attività trascrizionale di Gli1 indotta da HDAC1.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con il Gli-reporter luciferasico (12xGli-Luc) e con vettori di espressione codificanti per REN (con modalità dose-rescente) e per HDAC1. L'attività trascrizionale di Gli1 risulta aumentata in presenza di HDAC1, mentre si riduce progressivamente in presenza di dosi crescenti di REN sia in assenza ma soprattutto in presenza di HDAC1.

FIG. 18 C

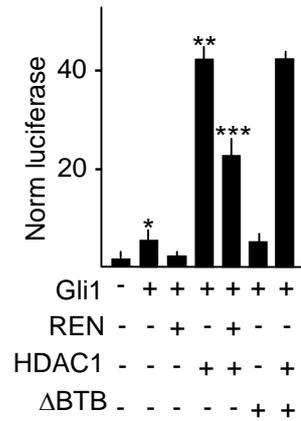


Fig.18 C: Il mutante di REN ΔBTB non ha alcun effetto sull'attività trascrizionale di Gli1.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con il Gli-reporter luciferasico (12xGli-Luc), insieme a vettori di espressione per REN, per HDAC1 e per REN ΔBTB. Il saggio luciferasico mostra che il mutante di REN è incapace di ridurre l'attività trascrizionale di Gli1, a differenza di quello che si osserva per la proteina wild type.

FIG. 18 D

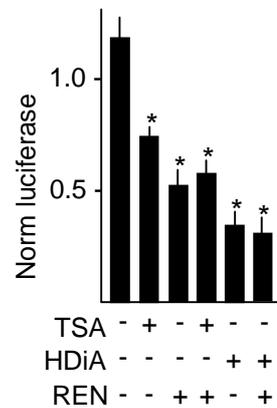


Fig.18 D: La presenza di HDAC1 è necessaria ai fini dell'inibizione REN-dipendente dell'attività di Gli1.

Cellule della linea MEF Ptc1^{-/-} sono state co-trasfettate con REN ed un reporter luciferasico per Gli e sottoposte alternativamente a trattamenti con TSA e con specifici inibitori delle iston-deacetilasi di classe 1 e 2: HdIA. L'abrogazione della funzione di HDAC1 porta all'annullamento della capacità di REN di abbattere l'attività trascrizionale di Gli1.

Tricostatina A (TSA) e con specifici inibitori per le iston-deacetilasi di classe 1 e 2: HdiA. L'abrogazione della funzione di HDAC1 attraverso trattamenti con TSA e HdiA, sembra portare all'annullamento della capacità di REN di abbattere l'attività di Gli1 (**Fig.18D**). Questo importante risultato suggerisce che REN è in grado di sopprimere il signaling di Hh attraverso la regolazione negativa di HDAC1.

5.4 L'espressione di HDAC1 è correlata all'attivazione della pathway di Hh nello sviluppo del cervelletto.

L'identificazione dei meccanismi regolatori positivi e negativi HDAC1-dipendenti sopra descritti, ha condotto ad indagare sul loro ruolo nello sviluppo delle cellule progenitrici dei granuli del cervelletto (GCPs), processo finemente regolato dalla pathway di Hh. A questo scopo è stata analizzata l'espressione di HDAC1 nelle GCPs del cervelletto negli stadi precoci dello sviluppo. Saggi di immunohistochemica condotti su sezioni di cervelletto murino dopo 4 giorni di vita post-natale (P4), hanno mostrato che l'espressione di HDAC1 e di Gli1 sono correlate nei vari stadi dello sviluppo del cervelletto; infatti HDAC1 e Gli1 sembrano essere espressi in maniera predominante nell'EGL esterno (**Fig.19A**), dove risiedono cellule altamente proliferanti. Al contrario, nelle stesse sezioni, è stata osservata una localizzazione di REN mutualmente esclusiva rispetto all'espressione di Gli1 ed HDAC1.

REN, infatti, risulta essere localizzato nell'EGL interno dove risiedono cellule che hanno iniziato un programma differenziativo (**Fig.19A**) (Argenti et al.,2005).

Nel loro insieme, questi dati, suggeriscono che REN potrebbe spegnere il signaling di Hh, permettendo così alle cellule di seguire un percorso differenziativo, proprio attraverso la soppressione dell'attività di HDAC1. La co-localizzazione di HDAC1 e Gli1 nell'EGL esterno suggerisce un ruolo specifico di HDAC1 nel promuovere la proliferazione delle GCPs. Come illustrato in figura **19B**, l'aumento della percentuale di proliferazione di colture primarie di granuli da topi P4 indotto da Shh, risulta fortemente ridotta in seguito a trattamento con l'inibitore delle deacetilasi TSA.

In seguito sono stati trattati topi di 3 giorni con la TSA o con il solvente di controllo (DMSO) e dopo 24 ore sono state isolate cellule GCPs per misurare i livelli dell'mRNA di alcuni geni target tramite PCR quantitativa. Nel grafico di figura **19C** per ciascun

FIG. 19 A

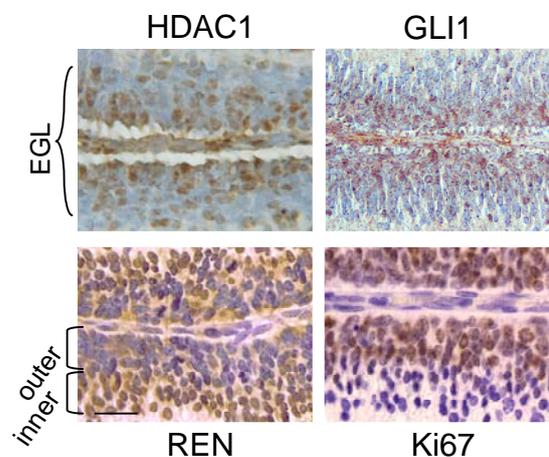


Fig.19 A: L'espressione di HDAC1 e di Gli1 sono correlate durante lo sviluppo del cervelletto.

Saggi di immunohistochemica su sezioni di cervelletto murino dopo 4 giorni di vita post-natale, mostrano che HDAC1 e Gli1 sono espressi prevalentemente nell'EGL esterno a differenza di REN, che risulta localizzato nell'EGL interno.

FIG. 19 B

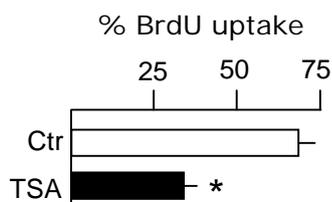


Fig.19 B: HDAC1 promuove la proliferazione delle GCPs.

Colture primarie di granuli da topi P4 sono state sottoposte a trattamento con Shh e TSA. Dopo 24h è stato condotto un saggio di proliferazione cellulare mediante incubazione con la BrdU. La percentuale di proliferazione risulta ridotta in seguito a trattamento con TSA.

gene è stato calcolato il rapporto tra i valori di mRNA di topi trattati con il DMSO con i valori di mRNA di topi trattati con la TSA.

Come si può vedere dal grafico, l'espressione di geni target Gli1-dipendenti sono downregolati, inclusi alcuni geni coinvolti nella proliferazione cellulare come le cicline e N-myc (**Fig.19C**). Presi insieme questi dati suggeriscono che l'attività di HDAC1 è in grado di aumentare la proliferazione, indotta da Shh, delle GCPs del cervelletto.

5.5 HDAC1 è up-regolato nel medulloblastoma ed è richiesto per la regolazione Hh-dipendente della crescita delle cellule tumorali

Dal momento che il medulloblastoma origina da una crescita incontrollata delle GCPs dovuta ad una deregolazione del signaling di Hh e, considerando che REN, come precedentemente descritto, risulta down-regolato in tutti i casi di medulloblastoma fino ad ora esaminati, si è ipotizzato che nei tumori potesse verificarsi un aumento dell'espressione e dell'attività di HDAC1.

Per validare tali ipotesi è stato condotto uno studio su diversi casi di MBs sia umani che murini, diretto a verificare i livelli di espressione di HDAC1. Come illustrato in esperimenti di immunostochimica su sezioni di MBs umani, i livelli della proteina HDAC1 risultano fortemente espressi rispetto al tessuto di controllo (**Fig.20A**). Allo stesso modo, esperimenti di Western blot condotti in campioni di MBs murini, derivati da tumori di topi Ptc+/-, mostrano livelli di HDAC1 significativamente superiori rispetto ai campioni non tumorali (**Fig.20A**).

Abbiamo voluto, inoltre, dimostrare che l'effetto inibitorio indotto da REN sulla crescita e sulla proliferazione cellulare, fosse strettamente connesso all'azione negativa che questa proteina svolge su HDAC1. A tal proposito cellule di medulloblastoma sono state trasfettate con un vettore di espressione codificante per REN, e sottoposte a trattamenti con specifici inibitori delle iston-deacetilasi: HDiA e HDiB, rispettivamente inibitori delle iston-deacetilasi di classe 1-2 e 1-3. Come si evince dalla figura **20B**, l'over-espressione di REN così come l'abrogazione della funzione di HDAC1, mediante trattamento con HDACi, determina una riduzione della proliferazione di cellule di medulloblastoma. Ciò che risulta di estremo interesse è che l'effetto inibitorio sulla crescita indotto da REN, si annulla quando la funzione di HDAC1 viene abrogata in seguito a somministrazione con HDiA e B (**Fig.20B**). La

FIG. 19 C

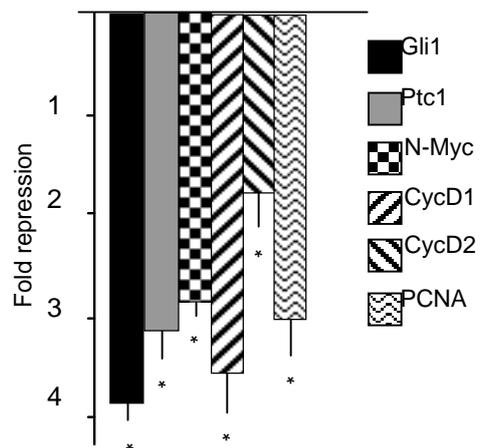


Fig.19 C: HDAC1 aumenta l'espressione dei geni target di Gli1.

Colture primarie di GCPs sono state sottoposte a trattamenti con TSA e Shh. Da saggi di Q-PCR si è rilevato un abbassamento dei livelli dell'mRNA della ciclinaD2 (gene target di Gli1) nei campioni trattati con TSA rispetto a quelli trattati con Shh.

funzione di HDAC1 è stata inibita non solo mediante trattamenti con inibitori specifici, ma anche abrogando i livelli endogeni di HDAC1 mediante RNA-interference. Cellule della linea di medulloblastoma Daoy sono state trasfettate con RNA-interference di HDAC1 o RNA-interference di controllo per 72 ore e poi trasfettate con REN per 48 ore. È stato così effettuato un saggio di proliferazione cellulare in cui, come si evince dal grafico di figura **20C** quando interferiamo HDAC1, REN non è più in grado di inibire la crescita cellulare (**Fig.20C**). Questi esperimenti confermano l'ipotesi secondo la quale l'azione antiproliferativa di REN dipende dalla sua capacità di annullare l'azione di HDAC1 che, viceversa, agisce da regolatore positivo della crescita cellulare. A conferma di questi dati abbiamo voluto verificare se il reinserimento di REN, mediante over-espressione, in cellule di medulloblastoma potesse ridurre i livelli endogeni di HDAC1.

Cellule della linea di medulloblastoma (Daoy) sono state, a tal proposito, trasfettate con vettore di espressione codificante per HA-REN o con vettore vuoto di controllo. Un'uguale quantità di lisato cellulare è stato sottoposta a Western blot usando anticorpi specifici per HDAC1. Come si osserva in figura **20D**, i livelli proteici di HDAC1 endogeno risultano diminuiti nei campioni trasfettati con REN, confermando ancora una volta il ruolo inibitorio di REN sull'espressione di HDAC1. Queste evidenze sperimentali in vivo, supportano ulteriormente la rilevanza che riveste la regolazione da parte di REN sulla funzione di Gli1 e sul ruolo esercitato da HDAC1, nello sviluppo Hh-dipendente delle GCPs cerebellari e nella crescita del medulloblastoma.

FIG. 20 A

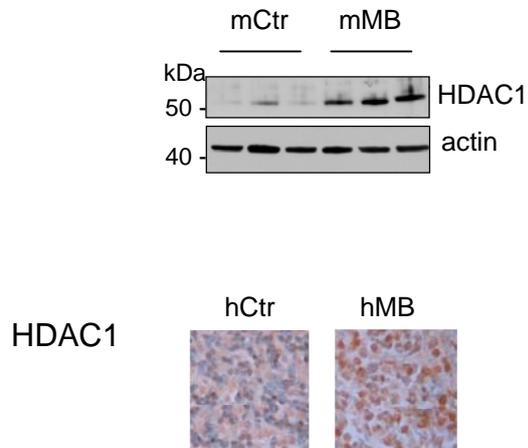


Fig.20 A: Saggi di immunohistochemica su sezioni di MBs umani mostrano livelli proteici di HDAC1 superiori rispetto al tessuto di controllo.

FIG. 20 B

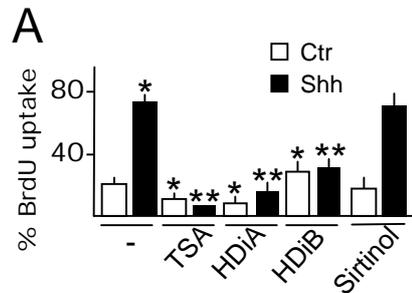


Fig.20 B: L'azione antiproliferativa di REN dipende dalla sua capacità di annullare l'azione di HDAC1.

Cellule di medulloblastoma Daoy sono state trasfettate con un vettore di espressione codificante per REN, e sottoposte a trattamenti con inibitori delle istone-deacetilasi: HDiA e HDiB. L'over-espressione di REN, così come l'abrogazione della funzione di HDAC1, mediante trattamento con HDACi, determina una riduzione della proliferazione di cellule di medulloblastoma. L'effetto inibitorio sulla crescita indotto da REN, si annulla quando la funzione di HDAC1 viene abrogata in seguito a somministrazione di HDiA e B.

FIG. 20 C

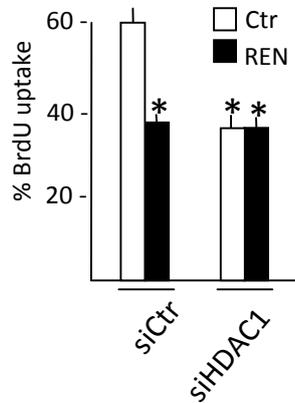


Fig.20 C: L'azione antiproliferativa di REN dipende dalla sua capacità di annullare l'azione di HDAC1.

Cellule della linea di medulloblastoma Daoy sono state trasfettate con RNA-interferenza di HDAC1 o RNA-interferenza di controllo per 72 ore e poi trasfettate con REN per 48 ore. È stato effettuato un saggio di incorporazione della Bromodeossiuridina per monitorare la proliferazione cellulare.

FIG. 20 D

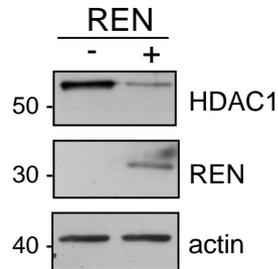


Fig.20 D: Il reinserimento di REN in cellule di medulloblastoma riduce i livelli endogeni di HDAC1.

Cellule della linea di medulloblastoma (Daoy) sono state trasfettate con vettore di espressione codificante per HA-REN o con vettore vuoto di controllo. Un'uguale quantità di lisato cellulare è stata sottoposta a Western blot usando anticorpi specifici per HDAC1. I livelli proteici di HDAC1 endogeno risultano diminuiti nei campioni trasfettati con REN.

6. DISCUSSIONE

Con questo lavoro è stato identificato un nuovo meccanismo di degradazione ubiquitina-dipendente coinvolto nella regolazione della proteina Gli1. Nel nostro laboratorio è stato identificato il gene REN^{KCTD11}, localizzato sul cromosoma 17p, come un oncosoppressore capace di antagonizzare l'attività di Hh (Di Marcotullio et al., 2004). È stato inoltre evidenziato il ruolo della deacetilasi HDAC1, molto espressa nei medulloblastomi, come regolatore positivo della proteina Gli1 (Canettieri et al., 2010). Questo dato risulta di notevole importanza dato il coinvolgimento delle HDACs nella regolazione di processi coinvolti nello sviluppo cellulare come il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi (Lagger et al., 2010; Zhou et al., 2011). Considerando queste funzioni è stato dimostrato che reprimendo le HDACs si possono prevenire conseguenze patologiche (Minucci et al., 2006). In letteratura è stato riportato che le HDAC1 e HDAC2 sono regolate da processi di degradazione ubiquitina-dipendenti e che per HDAC2 a differenza di HDAC1 sono già state identificate delle E3 ubiquitina-ligasi (Kramer et al., 2003).

Siamo riusciti ad identificare un nuovo complesso Cul3 E3 ubiquitina-ligasi responsabile dell'ubiquitinazione di HDAC1. Cul3, fa parte del complesso SCF-like, al quale appartengono adattatori capaci di interagire, proprio attraverso la regione BTB/POZ, con Cul3 stesso (Pintard et al., 2004; Stogios et al., 2005). Abbiamo così individuato una nuova "proteina adattatore": REN, capace di interagire con Cul3 e un nuovo substrato per il complesso Cul3 ubiquitina-ligasi. Il dominio BTB/POZ di REN è necessario per l'interazione con Cul3 e per promuovere l'ubiquitinazione di target proteici. REN è in grado di reclutare e indurre ubiquitinazione e degradazione di HDAC1. Questi risultati hanno confermato che HDAC1 rappresenta un nuovo substrato per il complesso Cul3/REN. Inoltre nel nostro laboratorio è stato dimostrato un diretto coinvolgimento di HDAC1 nella regolazione della pathway di Hedgehog, grazie alla sua capacità di attivare la funzione di Gli1 (Canettieri et al., 2010). Questo dato, insieme all'evidenza che REN promuove la degradazione di HDAC1, ci ha portato a ipotizzare un meccanismo la cui deregolazione può portare allo sviluppo di medulloblastoma Hedgehog-dipendente. Nel corso dello sviluppo delle GCPs cerebellari, l'espressione di REN e HDAC1 appare, infatti, mutuamente esclusiva. HDAC1 è espresso solo nell'EGL esterno, dove si osserva un'alta proliferazione cellulare e espressione di Gli1, mentre REN è espresso solo nell'EGL interno dove le

cellule non proliferano e iniziano un programma differenziativo. In accordo con questi dati è stato dimostrato che l'inibizione di HDAC1, mediante siRNA o specifici inibitori, determina una riduzione della proliferazione delle GCPs indotta da Shh. Inoltre in casi di medulloblastoma esaminati sono stati osservati alti livelli sia di HDAC1 e di Gli1 e una ridotta espressione di REN. È interessante mettere in evidenza il fatto che l'espressione ectopica di REN in cellule di medulloblastoma riduce significativamente i livelli basali di HDAC1 sia in vivo, che in vitro, causando l'arresto della crescita cellulare. L'insieme dei dati riportati ci suggerisce il ruolo oncosoppressore di REN come inibitore di Gli1 della crescita tumorale. REN, infatti nel promuove la degradazione di HDAC1, un attivatore del signaling di Hedgehog, previene lo sviluppo di neoplasie, come ad esempio il medulloblastoma. È stato così identificato un modello di regolazione sia positiva, che negativa del signaling di Hedgehog. Da un lato, infatti, HDAC1, aumentando l'attività di Gli1, mantiene alti i livelli del signaling di Hh; dall'altro REN promuovendo la degradazione di HDAC1 determina lo spegnimento dell'attivazione mediata da HDAC1 stesso. **(Fig.21)** Questi dati suggeriscono quindi l'esistenza di una via di regolazione del signaling di Hedgehog e della conseguente crescita tumorale. Questo potrebbe avere implicazioni importanti nello sviluppo di tumori ed inoltre mette in evidenza il ruolo degli HDACi come una promettente classe di chemioterapici utilizzabili per il trattamento del medulloblastoma e di altri tumori Hh-dipendenti.

FIG.21

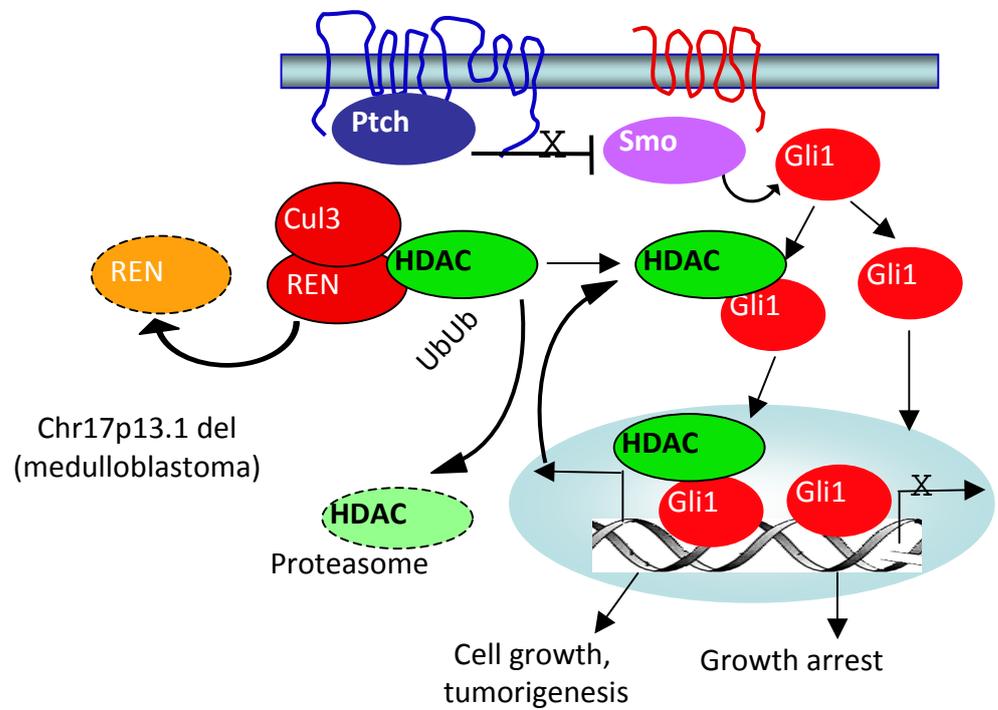


Fig.21: Modello della regolazione dell'attività di Gli1 mediata da REN e HDAC1.

HDAC1 è in grado di aumentare l'attività trascrizionale di Gli1, mantenendo alti i livelli del signaling di Hh. Questo evento viene "spento" dalla degradazione di HDAC1 attraverso l'attività ubiquitina-ligasica del complesso Cul3-REN. La perdita di REN, causata dalla delezione del cromosoma 17p porta all'accumulazione di HDAC ed all'aumento del signaling di Hedgehog, sostenendo quindi la crescita tumorale.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Anticorpi e plasmidi

Gli anticorpi: Anti-Gli1 (sc-20687; sc-6152), anti-hemagglutinin (HA) (sc-7392), anti-Myc (sc-40AC), anti-actin (sc-1616), anti-green fluorescent protein (sc-8334; sc-9996) e anti-GST (sc-138S) sono della casa produttrice Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; anti-Flag (M2), anti-Flag M2 agarose della casa produttrice Sigma (St Louis, MO, USA); anti-Itch della casa produttrice BD Bioscience, San Jose, CA, USA; anti-HDAC1 della casa produttrice Upstate. I seguenti plasmidi sono stati forniti da altri laboratori: pCS2-HA3-Gli1^{WT} (A Oro), pcDNA- Myc-Itch, -Flag-Itch, Flag-C830A and GST-Itch (M Alimandi), 12 × Gli-Luc (R Toftgard) and pcDNA-Flag-Numb (L D'Adamio), Cul2 e Cul3 (M. Pagano). Differenti mutanti di Gli1, Numb e REN sono stati costruiti utilizzando tecniche di clonaggio standard. Residui aminoacidici singoli o multipli sono stati mutati utilizzando il QuickChange site-directed mutagenesis kit o multi-site mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

7.2 Colture primarie

Le colture primarie dei granuli cerebellari sono state preparate da topi di 4 giorni come descritto da Wechsler-Reya R. J. E Scott M. P. (1999). I cervelletti sono stati rimossi asetticamente, tagliati in piccoli pezzi e incubati a temperatura ambiente per 15 minuti in una soluzione di digestione consistente in PBS, 0.1% di tripsina (sigma) 0.2% EDTA e 0.1% mg/ml di DNase (sigma). Successivamente, dopo aver bloccato la tripsina con due volumi di PBS 10% FBS, i tessuti sono stati triturati in una soluzione di terreno contenente 5% FBS e 0.1mg/ml di DNase, fino ad ottenere una sospensione di cellule singole. Le cellule sono state quindi centrifugate e sospese in terreno Neurobasal (Life Technologies) supplemento con B27 (Life Technologies), penicillina\streptomycina e glutammina (2mM). I granuli sono stati piastrati su supporti con 1 mg/ml di polilissina ad una densità di 8×10^8 cellule/cm².

7.3 Colture cellulari e trasfezioni

La linea cellulare umana HEK293, è stata cresciuta in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium, con aggiunta FBS al 10%, antibiotici e glutammica al 5%.

La linea cellulare di medulloblastoma Daoy e D283 sono state cresciute in terreno MEM con l'aggiunta rispettivamente di 10 e 20% di FBS, sodio piruvato, amminoacidi non essenziali, glutammina e antibiotici al 5%. Le cellule MEF Ptc^{-/-} sono state cresciute in DMEM plus, con aggiunta di FBS ed antibiotici.

Per le trasfezioni delle cellule D283, i vetrini e le piastre utilizzate sono state prima trattate con poli-L-lisina (10mg/ml) (Sigma-Aldrich).

Le cellule dei granuli sono state trasfettate utilizzando la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) secondo il protocollo messo a punto da Ono T., et al 2003. La quantità di DNA e di reagente utilizzate nelle trasfezioni sono state stabilite grazie a prove preliminari in accordo con quanto suggerito dalle case produttrici dei diversi kit commerciali.

Le trasfezioni nelle linee cellulari D283 e HEK293, sono state effettuate utilizzando Lipofectamine 2000 ed il buffer di trasfezione OptiMem (Invitrogen). La quantità di DNA e di reagenti usate sono state stabilite in base a quanto suggerito dalle case produttrici dei Kit. Per la linea cellulare di medulloblastoma Daoy abbiamo usato la Lipofectamine Reagent (Invitrogen), con aggiunta del Plus Reagent (Invitrogen). Nei granuli e nelle diverse linee cellulari il saggio luciferasico è stato condotto utilizzando il Dual Luciferase assay system (Promega) 24h dopo la trasfezione con 0.7microg di DNA per pozzetto da 48 Well, includendo il reporter luciferasi e il vettore di espressione Renella-pRL-TK promega come descritto in Di Marcotullio et al 2004.

Per l'RNA-interference le cellule sono state trasfettate utilizzando un pools di siRNA duplexes (da 50 a 100 nm) mediante lipofectamine 2000 come descritto in Canettieri et al., 2010.

7.4 Immunoprecipitazione

Le cellule trasfettate, cresciute a confluenza, sono state lavate per due volte in PBS e lisate con un buffer di lisi (50mM Tris-HCl pH 7.6; Deossicolato 1%; NaCl 140mM; NP40 1%, EDTA 5mM; NaF 100mM) con aggiunta degli inibitori delle proteasi: 40mg/ml aprotinina, pepstatina, leupeptina, 0.5mM PMSF, sodio orto vanatato, e messe in ghiaccio per 15 min. Il lisato proteico è stato recuperato dopo

centrifugazione a 13000rpm per 30 min a 4°C. Gli estratti proteici sono stati quantificati attraverso lettura allo spettrofotometro utilizzando il saggio Bradford. Per le coimmunoprecipitazioni sono stati incubati 800mg di proteina con anticorpo anti- Flag M2 agarose coniugated (Sigma) per 2h in agitazione su ruota a +4°C. Nei campioni di controllo negativo l'anticorpo è stato saturato con peptide anti-Flag per 2h in agitazione su ruota a +4°C. Dopo diversi lavaggi la resina è stata bollita in sample buffer con l'aggiunta di 1/10 di sample buffer reducing (Invitrogen) per 5 minuti ed infine analizzate mediante Western-blot con un anticorpi anti-HA HRP o anti-Myc HRP (Santa Cruz Biotechnology). Gli estratti totali o frazionati, sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) gradientati 3-8% Tris-Acetati o 4-12% Bis-Tris (NuPage Invitrogen). Le proteine migrate nel gel sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Nitrocellulosa Membrane Filter Paper Sandwich Invitrogen), sotto campo elettrico usando un tampone di trasferimento al 15% di metanolo. Per eliminare legami aspecifici i filtri sono stati saturati per 1 h a temperatura ambiente con una soluzione costituita da 5%di latte (Biorad) in TBS-T (10mM Tris-HCl pH8, 160mM NaCl, 1% tween 20) e quindi incubati con l'anticorpo primario, opportunamente diluito in TBS-T e latte. Dopo un'ora di incubazione a t.a. e dopo tre lavaggi in TBS-T, i filtri sono stati incubati con l'anticorpo secondario specifico. Dopo una serie di lavaggi, gli estratti presenti sul filtro sono stati evidenziati con una reazione di chemiluminescenza (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA). Per l'inibizione del proteosoma, le cellule trasfettate sono state incubate per 4h a 37°C con 50 µM di MG132 o con DMSO, usato come controllo, in terreno DMEM con l'aggiunta di siero.

7.5 Immunoistochimica

Sezioni di cervelletto di 3mM di spessore, sono state deparaffinate, reidratate e incubate over-night con gli anticorpi anti-Gli1 rabbit ed anti-HDAC1 rabbit diluiti rispettivamente, 1:200 e 1:50.

Dopo due lavaggi con una soluzione di PBS, è stato applicato l'anticorpo secondario biotinilato antirabbit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ed incubato per un' ora a 4°C. la rilevazione del segnale è stata fatta utilizzando il KIT Vectastain ABC (vector) e come substrato la 3-3'diaminobenzidina (DAB). I nuclei sono stati controcolorati con l'ematossilina.

7.6 Estrazione di RNA da colture cellulari e RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle colture cellulari lisando direttamente sulla piastra mediante l'uso di Trizol (Invitrogen).

L'RNA estratto è stato quantizzato mediante lettura allo spettrofotometro. L'RNA è stato poi retrotrascritto con Superscript II reverse transcriptase e random hexamers (Invitrogen). L'analisi dei livelli di espressione degli mRNA di Gli1 ed HDAC1 è stata realizzata tramite PCR quantitativa (Q-PCR). La Q-PCR è stata eseguita su ogni campione di cDNA usando la ABI prism 7900 Sequence detection System e Assay-on-Demand Reagent (Applied Biosystem).

Ogni mix di reazione contiene il template di cDNA, la TaqMan Universal PCR master mix (ABI) e la mix di primer.

Ogni reazione di amplificazione è stata realizzata in triplicato e la media dei tre cicli threshold è stata usata per calcolare la quantità di trascritto in ogni campione.

Tutti i valori sono stati normalizzati rispetto ad un gene housekeeping, b-actin.

7.7 Ubiquitinazione in vitro

Cellule HEK293 sono state trasfettate con i plasmidi codificanti per le proteine REN-HA e Δ BTB-HA. In seguito, i lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con specifici anticorpi coniugati ad una resina. Gli immunocomplessi così ottenuti sono stati incubati a 30°C con 50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 200 μ M acido ocaico, 2mM ATP, 0.6mM DTT, 1mM ubiquitinaldeide, E1, Ubc3, Ubc5 ed Ubiquitina-Flag. I prodotti Flag-poliubiquitinati così ottenuti sono stati sottoposti a corsa su SDS-PAGE e successivamente sottoposti a Western blot con anticorpo anti-Flag.

7.8 Saggio di GST pull-down

Prima di effettuare la reazione di binding tra la proteina di interesse e la proteina di fusione Glutathione S-trasferasi (GST) è stato effettuato un pre-clearing per ogni punto

sperimentale. Il lisato di cellule trasfettate con plasmidi di nostro interesse (circa 1,5 mg) o proteine in vitro traslate è stato incubato con 70 μ l di beads di glutadione-sefariosio e 2 μ g di concentrazione finale di GST per circa 1 ora a 4°C. La mix è stata centrifugata a 4°C per due minuti e è stato recuperato il sovra-natante che è stato diviso in due eppendorf di ugual volume: a un'eppendorf sono stati aggiunti 2 μ g di concentrazione finale di proteina GST di controllo e all'altra 2 μ g di concentrazione finale di proteina GST di fusione. Queste mix sono state incubate per 2 ore a 4°C in un binding buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid 20 mM, MgCl₂ 2mM, KCl 100mM, 20% glycerol, EDTA 0.2mM, 0.05% NP40). Dopo una serie di lavaggi i campioni sono sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) e analizzati mediante fluorografia o immunoblotting.

7.9 Saggi di proliferazione cellulare, formazione di colonie, formazione di foci, di migrazione e di invasione.

Il saggio di proliferazione cellulare è stato eseguito mediante l'utilizzo della bromuro-deossiuridina (BrdU) (Roche) dopo 24h dalla trasfezione cellulare con i plasmidi pcDNA Numb-Flag. Le GCPs dopo l'incorporazione della BrdU, sono state fissate e permeabilizzate e successivamente incubate per 30 minuti a 37°C con anticorpo mouse BrdU. Dopo 3 lavaggi in PBS le cellule sono state incubate per 30 minuti con il loro specifico anticorpo secondario coniugato alla rodamina. I nuclei sono stati colorati con 1mg/ml di Hoechst 33258 per 5 minuti prima di essere montati inVectashied.

Per la crescita cellulare in assenza di adesione al substrato è stato effettuato un test di crescita in soft agar. 1×10^5 cellule trasfettate di D283 sono state sospese in un mezzo di crescita contenente lo 0.3% di agarosio e piastrate su uno strato di agarosio allo 0.7% nello stesso mezzo di coltura. Dopo 14 giorni dalla piastratura le colonie di 400 cellule vengono contate in 10 campi rappresentativi per ogni piastra.

Il saggio di formazione di foci è stato effettuato in cellule di rene di ratto (RK3E) piastrate in dish da 100mm e trasfettate con 10 μ g di quantità totale di DNA. Dopo la trasfezione sono state fatte crescere per tre settimane, fissate, colorate con cristalviolet e è stato contato il numero di foci. Tutti i saggi di proliferazioni sono stati

effettuati in triplicato e il risultato finale rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti.

Per la migrazione di cellule di medulloblastoma attraverso una membrana è stato utilizzato il Transwell filter insert assemblato su piastre da 24-well (Costar, Bethesda, MD, USA). Per il test di invasione è stata utilizzata una membrana ricoperta da Matrigel (BD Bioscience) come descritto in Guerreiro et al., 2008. La percentuale di invasione è stata determinata seguendo le istruzioni del manuale.

7.10 Analisi statistica

I risultati sono espressi come \pm la deviazione standard (DS) a partire da un numero appropriato di esperimenti, come è indicato nelle legende delle figure. Ogni esperimento è rappresentato da un'unica coltura primaria di GCPs ottenuta a partire da un pool di 10-16 topi. Le differenze statistiche sono state analizzate con il test Mann-Whitney U per valori non parametrici con il software StatView 4.1 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Valori con un $p < 0.005$ sono stati considerati statisticamente significativi.

8. BIBLIOGRAFIA

-Altman, J. and S. A. Bayer (1997). Development of the cerebellar system : in relation to its evolution, structure, and functions. Boca Raton, CRC Press.

-Angers, S., C. J. Thorpe, et al. (2006). "The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation." *Nat Cell Biol* 8(4): 348-57.

-Argenti, B., R. Gallo, et al. (2005). "Hedgehog antagonist REN(KCTD11) regulates proliferation and apoptosis of developing granule cell progenitors." *J Neurosci*.25(36): 8338-46.

-Baryawno N., Sveinbjörnsson B, Kogner P, Johnsen JI. (2010) "Medulloblastoma: a disease with disorganized developmental signaling cascades" *Cell Cycle*. Jul 26;9(13).

-Bedford MT, Sarbassova D, Xu J, Leder P, Yaffier MB. (2000). "A novel Pro-Arg motif recognized by WW domains." *J Biol Chem* 275: 10359-10369.

-Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. (2008) "The HECT family of E3 ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell*. Jul 8;14(1):10-21. Review.

-Bigner, S. H., R. E. McLendon, et al. (1997). "Chromosomal characteristics of childhood brain tumors." *Cancer Genet Cytogenet* 97(2): 125-34.

-Buschmann, T., S. Y. Fuchs, et al. (2000). "SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53." *Cell* 101(7): 753-62.

- Canettieri G, Di Marcotullio L, Greco A, Coni S, Antonucci L, Infante P, Pietrosanti L, De Smaele E, Ferretti E, Miele E, Pelloni M, De Simone G, Pedone EM, Gallinari P, Giorgi A, Steinkühler C, Vitagliano L, Pedone C, Schinin ME, Screpanti I, Gulino A. (2010) "Histone deacetylase and Cullin3-REN (KCTD21) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signaling through Gli acetylation". *Nat Cell Biol*. Feb;12(2):132-42. Epub 2010 Jan 17.

- Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M. (2006) "The E3 ubiquitin ligase Itch couples JNK activation to TNF alpha-induced cell death by c-FLIP (L) turnover." *Cell*. Feb 10;124(3):601-13.
- Chau, V., J. W. Tobias, et al. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." *Science* 243(4898): 1576-83.
- Cheng, S. Y. and J. M. Bishop (2002). "Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5442-7.
- Cogen, P. H. and J. D. McDonald (1996). "Tumor suppressor genes and medulloblastoma." *J Neurooncol* 29(1): 103-12.
- Courbard JR, Fiore F, Adelaide J, Borg JP, Birnbaum D, Ollendorff V. (2002). "Interaction between two ubiquitin-protein isopeptide ligases of different classes, CBLC and AIP4/ITCH." *J Biol Chem* 277: 45267-45275.
- Dhall G., (2009) "Medulloblastoma" *J. Child Neurol.* 24:1418-1430
- Deng, L., C. Wang, et al. (2000). "Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." *Cell* 103(2): 351-61.
- De Smaele E, Di Marcotullio L, Ferretti E, Screpanti I, Alesse E, Gulino A. (2004) "Chromosome 17p deletion in human medulloblastoma: a missing checkpoint in the Hedgehog pathway" *Cell Cycle* Oct;3(10):1263-6. Epub 2004 Oct 3. Review.
- Di Marcotullio, L., E. Ferretti, et al. (2004). "REN(KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10833-8.
- Di Marcotullio, L., E. Ferretti, et al. (2006). "Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination." *Nat Cell Biol* 8(12): 1415-23.

- Ding, Q., S. Fukami, et al. (1999). "Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1." *Curr Biol* 9(19): 1119-22.
- Ellison, D. (2002). "Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics." *Neuropathol Appl Neurobiol* 28(4): 257-82.
- Fang D, Kerppola TK. (2004). "Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes." *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14782–14787.
- Ferretti E, Smaele ED, Marcotullio LD, Screpanti I, Gulino A. Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. (2005) *Trends Mol Med*. Dec;11(12):537-45. Epub 2005 Nov 14. Review.
- Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M. (2006) " Activation of the E3 ubiquitin ligases Itcg through a phosphorylation-induced conformational change" *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 7;103(6):1717-22.
- Gallo, R., F. Zazzeroni, et al. (2002). "REN: a novel, developmentally regulated gene that promotes neural cell differentiation." *J Cell Biol* 158(4): 731-40.
- Galvin KE, Ye H, Erstad DJ, Feddersen R, Wetmore C. (2008). "Gli1 induces G2/M arrest and apoptosis in hippocampal but not tumor-derived neural stem cells." *Stem Cells* 26: 1027–1036.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
- Giannini, G., E. Alesse, et al. (2001). "EGF regulates a complex pattern of gene expression and represses smooth muscle differentiation during the neurotypic conversion of the neural-crest-derived TC-1S cell line." *Exp Cell Res* 264(2):353-62.
- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, et al. (1997). "Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants." *Science* 277(5329): 1109-13.

- Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I.(2010) "The multiple functions of Numb" *Exp Cell Res.* Apr 1;316(6):900-6. Epub 2009 Nov 26. Review.
- Haas AL, Siepmann TJ. (1997). "Pathways of ubiquitin conjugation." *FASEB J* 11: 1257–1268.
- Hatten, M. E. and N. Heintz (1995). "Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum." *Annu Rev Neurosci* 18: 385-408.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* 67: 425-79.
- Hicke, L. (1999). "Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels." *Trends Cell Biol* 9(3): 107-12.
- Ho, K. S. and M. P. Scott (2002). "Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms." *Curr Opin Neurobiol* 12(1): 57-63.
- Hooper, J. E. and M. P. Scott (2005). "Communicating with Hedgehogs." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 306-17.
- Huntzicker, E. G., I. S. Estay, et al. (2006). "Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation." *Genes Dev* 20(3): 276-81.
- Ikeda A, Caldwell RG, Longnecker R, Ikeda M. (2003). "Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling." *J Virol* 77: 5529–5534.
- Jiang, J. and G. Struhl (1998). "Regulation of the Hedgehog and Wingless signaling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb." *Nature* 391(6666): 493-6.
- Kent, D., E. W. Bush, et al. (2006). "Roadkill attenuates Hedgehog responses through degradation of Cubitus interruptus." *Development* 133(10): 2001-10.

- Kogerman, P., T. Grimm, et al. (1999). "Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1." *Nat Cell Biol* 1(5): 312-9.
- Kramer, O. H., P. Zhu, et al. (2003). "The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2." *Embo J* 22(13):3411-20.
- Kumar, S., A. L. Talis, et al. (1999). "Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination." *J Biol Chem* 274(26): 18785-92.
- Lagger S, Meunier D, Mikula M, Brunmeir R, Schlederer M, Artaker M, Pusch O, Egger G, Hagelkruys A, Mikulits W, Weitzer G, Muellner EW, Susani M, Kenner L, Seiser C. (2010) "Crucial function of histone deacetylase 1 for differentiation of teratomas in mice and humans" *EMBO J*. Dec 1;29(23):3992-4007. Epub 2010 Oct 22.
- Laney, J. D. and M. Hochstrasser (1999). "Substrate targeting in the ubiquitin system." *Cell* 97(4): 427-30.
- Li HS, Wang D, Shen Q, Schonemann MD, Gorski JA, Jones KR, Temple S, Jan LY, Jan YN. (2003) "Inactivation of Numb and Numb-like in embryonic dorsal forebrain impairs neurogenesis and disrupts cortical morphogenesis" *Neuron*. Dec 18;40(6):1105-18.
- Liu YC (2004) "Ubiquitin ligase and the immune response" *Annu Rev Immunol*. 2004;22:81-127. Review.
- Lohr NJ, Molleston JP, Strauss KA, Torres-Martinez W, Sherman EA, Squires RH *et al.* (2010). Human ITCH E3 ubiquitin ligase deficiency causes syndromic multisystem autoimmune disease. *Am J Hum Genet* 86: 447–453.
- Lorick, K. L., J. P. Jensen, et al. (1999). "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20):11364-9.
- Lu, P. J., X. Z. Zhou, et al. (1999). "Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules." *Science* 283(5406): 1325-8.
- Macias MJ, Wiesner S, Sudol M. (2002). "WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 513: 30–37."

-Magnifico A, Ettenberg S, Yang C, Mariano J, Tiwari S, Fang S et al. (2003). "WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation." J Biol Chem 278: 43169–43177.

-McGill MA, McGlade CJ. (2003) "Mammalian Numb promote ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain" J Biol Chem. Jun 20;278(25):23196-203. Epub 2003 Apr 7.

-Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, Scialpi F, Malatesta M, Zocchi L, Browne G, Ciechanover A, Bernassola F. (2008) "Itch: a HECT-type E3 Ligase regulating immunity, skin and cancer." Cell Death Differ. 2008 Jul;15(7):1103-12. Review

-Methot, N. and K. Basler (2001). "An absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling." Development 128(5): 733-42.

-Minucci S., and Pellicci P.G., (2006) "Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetics (and more) treatment of cancer. Nature Rev. Cancer 6, 38-51.

-Mouchantaf R, Azakir B, McPherson P, Millard S, Wood S, Angers A. (2006). The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated *in vivo* and *in vitro* but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. J Biol Chem 281: 38738–38747.

- Mund T, Pelham HR. (2009) "Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins" EMBO RepMay;10(5):501-7. Epub 2009 Apr 3.

-Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila" Nature 287(5785): 795-801.

-Oliver TG, Read TA, Kessler JD, Mehmeti A, Wells JF, Huynh TT, Lin SM, Wechsler-Reya RJ. "Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma" (2005). Development. May;132(10):2425-39. Epub 2005 Apr 2000.

- Omerovic J, Santangelo L, Puggioni EM, Marrocco J, Dall'Armi C, Palombo C et al. (2007). "The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation." *FASEB J* 21: 2849–2862.
- Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG. (1998). "The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice." *Nat Genet* 18: 143–146.
- Petersen et al., (2002) "Progenitor cells maintenance requires numb and numb like during mouse neurogenesis". *Nature*. Oct 31;419(6910):929-34.
- Petersen PH, Zou K, Krauss S, Zhong W (2004). "Continuing role for mouse Numb and NumbI in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis" *Nat Neurosci*. Aug;7(8):803-11. Epub 2004 Jul 25.
- Pickart, C. M. (2001). "Ubiquitin enters the new millennium." *Mol Cell* 8(3): 499-504.
- Pintard, L., A. Willems, et al. (2004). "Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family." *Embo J* 23(8): 1681-7.
- Pintard, L., J. H. Willis, et al. (2003). "The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase." *Nature* 425(6955): 311-6.
- Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y et al. (2000). "Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase." *J Biol Chem* 275: 35734–35737.
- Roegiers and Jan, (2004) Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*. Apr;16(2):195-205. Review.
- Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC *et al.* (2005). "The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability." *EMBO J* 24: 836–848.
- Ruiz i Altaba, A., V. Palma, et al. (2002). "Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain." *Nat Rev Neurosci* 3(1): 24-33.

- Ruppert JM, Vogelstein B, Kinzler KW. (1991). "The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A." *Mol Cell Biol* 11: 1724–1728.
- Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE et al. (2008). "The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin editing enzyme A20." *Nat Immunol* 9: 254–262.
- Scheffner, M., B. A. Werness, et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* 63(6):1129-36.
- Schulman, B. A., A. C. Carrano, et al. (2000). "Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex." *Nature* 408(6810): 381-6.
- Shen et al., (2002) "Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts." *Development*. 2002 Oct;129(20):4843-53.
- Scotting PJ, Walker DA, Perilongo G. (2005) "Childhood solid tumours: a developmental disorder" *Nat Rev Cancer*. Jun;5(6):481-8. Review.
- Screpanti, I., S. Scarpa, et al. (1995). "Epidermal growth factor promotes a neural phenotype in thymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression." *J Cell Biol* 130(1): 183-92.
- Stogios, P. J., G. S. Downs, et al. (2005). "Sequence and structural analysis of BTB domain proteins." *Genome Biol* 6(10): R82.
- Sudol M, Recinos CC, Abraczinskas J, Humbert J, Farooq A. (2005). "WW or WoW: the WW domains in a union of bliss." *IUBMB Life* 57: 773–778.
- Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, Gulino A, Screpanti I.(2008) "Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes" *Biochim Biophys Acta*. Sep;1782(9):489-97. Epub 2008 Jun 24. Review.

- Taylor, M. D., L. Liu, et al. (2002). "Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma." *Nat Genet* 31(3): 306-10.
- Tempe, D., M. Casas, et al. (2006). "Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP." *Mol Cell Biol* 26(11): 4316-26.
- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F *et al.* (2002). "The tight junction specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch." *J Biol Chem* 277: 10201-10208.
- Vacca, A., L. Di Marcotullio, et al. (1999). "Thrombospondin-1 is a mediator of the neurotypic differentiation induced by EGF in thymic epithelial cells." *Exp Cell Res* 248(1): 79-86.
- Wang, V. Y. and H. Y. Zoghbi (2001). "Genetic regulation of cerebellar development." *Nat Rev Neurosci* 2(7): 484-91.
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP. (1999) "Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*. Jan;22(1):103-14.
- Wechsler-Reya, R. and M. P. Scott (2001). "The developmental biology of brain tumors." *Annu Rev Neurosci* 24: 385-428.
- Winberg G, Matskova L, Chen F, Plant P, Rotin D, Gish G, Ingham R, Ernberg I, Pawson T. (2000) "Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus bins WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases." *Mol Cell Biol*. Nov;20(22):8526-35.
- Wu, K., S. Y. Fuchs, et al. (2000). "The SCF(HOS/beta-TRCP)-ROC1 E3 ubiquitin ligase utilizes two distinct domains within CUL1 for substrate targeting and ubiquitin ligation." *Mol Cell Biol* 20(4): 1382-93.
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schüller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ. (2008) "Medulloblastoma

can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells" *Cancer Cell*. Aug 12;14(2):135-45.

-Yun-Cai Liu (2007) "The E3 ubiquitin ligase Itch in T cell activation, differentiation and tolerance" *Semin Immunol*. June ; 19(3): 197–205.

-Zhang, D. D., S. C. Lo, et al. (2004). "Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex." *Mol Cell Biol* 24(24):10941-53.

-Zhang, Q., L. Zhang, et al. (2006). "A hedgehog-induced BTB protein modulates hedgehog signaling by degrading Ci/Gli transcription factor." *Dev Cell* 10(6):719-29.

-Zhong W, Jiang M.M, Schonemann M.D, Meneses J.J, Pedersen R. A., Jan L. Y.,(2000) Mouse numb is essential gene involved in cortical neurogenesis. *Pnas*; 97:6844-6849.

- Zhou W, Liang IC, Yee NS. (2011) "Histone deacetylase 1 is required for exocrine pancreatic epithelial proliferation in development and cancer" *Cancer Biol Ther*. Apr 1;11(7).

-Zollman, S., D. Godt, et al. (1994). "The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10717-21.

