



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOLOGIA
MOLECOLARE**

XXII CICLO

***CARATTERIZZAZIONE DEL
FENOTIPO EPIDERMICO DEL
TOPO KNOCKOUT PER ITCH***

Alessandro Giamboi Miraglia

Docente Guida/Tutor: *prof. G. Melino/dr.ssa E. Candi*

Coordinatore: *prof. A. Finazzi-Agrò*

Ad Antonella e tutta la mia famiglia
che mi hanno sostenuto sempre
in questi tre anni

INDICE	I
RIASSUNTO	V
ABSTRACT	VII
PAROLE CHIAVE	IX

INTRODUZIONE

Il differenziamento epidermico	1
• L'involucro corneo	2
• Le transglutaminasi.....	2
• I filamenti intermedi di cheratina	4
• Proteine dell'involucro corneo	5
• L'adesione cellulare nell'epidermide.....	8
• Ruolo delle proteasi nel differenziamento epidermico	10
• La componente lipidica dell'involucro corneo	12
• Modelli animali con difetti nella formazione dell'involucro corneo	13
L'ubiquitilazione	20
• L'ubiquitina	20
• Biochimica del processo di ubiquitilazione: gli enzimi E1, E2 ed E3	23
• Le E3 ubiquitina ligasi	25
• Le E3 ubiquitina ligasi RING finger	26
• Le E3 ubiquitina ligasi HECT	28
La E3 ubiquitina ligasi Itch	30
• Fenotipo immunologico del topo <i>Itchy</i>	30
• I substrati di Itch	32
• Regolazione dell'attività catalitica di Itch	38
SCOPO DEL LAVORO	47

RISULTATI

• Analisi morfologica dell'epidermide dei topi <i>Itch</i> ^{-/-}	51
• Proliferazione dei cheratinociti <i>Itch</i> ^{-/-}	51
• Espressione dei marcatori epidermici nei topi <i>Itch</i> ^{-/-}	54

• Differenziamento dei cheratinociti Itch ^{-/-}	54
• Espressione dei substrati di Itch nei topi Itch ^{-/-}	56
• Formazione della barriera epidermica nei topi Itch ^{-/-}	59
• Esposizione ai raggi UVB dei topi Itch ^{-/-}	59
• Ruolo di Itch nel riparo della ferita	60
DISCUSSIONE	67
MATERIALI E METODI	
• Animali	75
• Colture cellulari	75
• Istologia e immunofluorescenza	75
• Microscopia confocale	76
• Misurazione dello spessore epidermico	76
• Incorporazione della bromodeossiuridina (BrdU)	76
• Espressione dei substrati di Itch nell'epidermide	77
• Saggio di formazione della barriera epidermica	77
• Esposizione ai raggi UVB	78
• Western blot	78
• PCR real-time	79
• Ferite	79
BIBLIOGRAFIA	83
CURRICULUM VITAE	103
PUBBLICAZIONI	107

RIASSUNTO

Itch è una E3 ubiquitina ligasi appartenente alla famiglia HECT, mancante nei topi non-agouti-lethal 18H, anche conosciuti come topi *Itchy* (*Itch^{-/-}*), i quali manifestano gravi difetti immunitari e infiammatori e un prurito persistente. Infatti, molti dei suoi substrati sono importanti fattori che regolano la risposta immunitaria e la morte cellulare. Alcuni substrati di Itch sono inoltre fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo epidermico, come p63, cJun, JunB e Notch1. Lo scopo di questo studio è di analizzare il fenotipo epidermico dei topi *Itch^{-/-}*, sia in condizioni normali sia in seguito a stress fisiologici (irradiazione UV e riparo della ferita).

I risultati ottenuti mostrano che l'attività di Itch è importante durante la morfogenesi epidermica, infatti, i topi nascono con un'epidermide più spessa, a causa dell'aumento della proliferazione dei cheratinociti dello strato basale. Inoltre, il differenziamento epidermico è ritardato nei topi *Itch^{-/-}* appena nati, nonostante la formazione della barriera epidermica rimanga inalterata. Infine, nei topi *Itch^{-/-}* il processo di riparo della ferita è più accelerato, probabilmente a causa dell'aumento della proliferazione dei cheratinociti.

Per tanto i risultati ottenuti suggeriscono che la E3 ubiquitina ligasi Itch ha un ruolo nel controllo di due processi fisiologici: (i) la proliferazione epidermica durante lo sviluppo della cute; (ii) la chiusura della ferita nell'epidermide degli adulti.

ABSTRACT

The HECT-type E3 ubiquitin ligase Itch is absent in the non-agoti-lethal 18H or *Itchy* mice ($Itch^{-/-}$), which develop severe immune and inflammatory defects and manifest persistent scratching of the skin. Indeed, among its substrates there are some important in immune response and cell death. A number of Itch targets are also transcriptional factors involved in epidermal formation, such as p63, cJun, JunB, Notch1. The aim of this study is to analyze the epidermal phenotype of $Itch^{-/-}$ mice in normal conditions and under physiological stress (UV irradiation and wound healing).

The results obtained show that Itch activity is important during epidermal morphogenesis, indeed mice are born with a thicker epidermis due to an increase of the proliferation rate of the basal layer keratinocytes. In parallel, skin differentiation is delayed in $Itch^{-/-}$ newborn mice, although the formation of the skin barrier remains normal. Interestingly, we have evaluated that $Itch^{-/-}$ mice have an accelerated wound healing process, probably due to an increase in keratinocyte proliferation.

All together the results obtained suggest that the E3 ubiquitin ligase Itch has a role in controlling two physiological processes: (i) epidermal proliferation during skin development; (ii) wound closure in adult epidermis.

PAROLE CHIAVE

Differenziamento epidermico, proliferazione, ubiquitilazione, Itch, topi knockout.

INTRODUZIONE

Il differenziamento epidermico

L'epidermide è un epitelio pluristratificato che si trova saldamente ancorato al derma, attraverso la membrana basale. Il tessuto epidermico è costituito per lo più da cellule epiteliali di origine ectodermica, i cheratinociti, disposte in strati sovrapposti, in cui si trovano sparse cellule di diversa origine embrionale (melanociti, cellule di Langerhans, cellule di Merkel) migrate nell'epidermide durante le prime fasi dello sviluppo e in periodi successivi alla nascita. L'epidermide è costituita da quattro strati cellulari (**Fig. 1**), che rappresentano i quattro principali stadi differenziativi del cheratinocita: lo strato basale, posto sopra la membrana basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso e, in superficie, lo strato corneo. Lo strato basale rappresenta il compartimento proliferativo del tessuto ed è costituito da un monostato di cheratinociti cuboidali fissati alla membrana basale attraverso emidesmosomi e giunzioni aderenti. I cheratinociti basali, caratterizzati da un'intensa attività mitotica, presentano un grosso nucleo ovale che occupa la maggior parte della cellula e un citoplasma in cui sono dispersi tonofilamenti, melanosomi e numerosi ribosomi liberi, caratteristici di un'intensa attività metabolica. Tra i cheratinociti dello strato basale si distinguono le cellule staminali, che mantengono un'elevata capacità proliferativa lungo tutta la vita adulta, e le cellule che dopo un certo numero di divisioni vanno incontro a differenziamento epidermico terminale (Jones et al., 1993). Lo strato spinoso è costituito da diversi strati cellulari che possono variare da 5 a 10 a seconda delle regioni corporee e rappresenta il settore maturativo dell'epidermide (Saurat et al., 1991). I cheratinociti appaiono di forma poliedrica e connessi fra loro da numerose interdigitazioni desmosomiali della membrana plasmatica che conferiscono alle cellule il loro tipico aspetto spinoso. Lo strato granuloso costituisce il settore differenziativo pre-terminale, caratterizzato morfologicamente dalla presenza di grossi granuli irregolari detti di cheratoialina, dai corpi lamellari e granuli di Odland e da alterazioni involutive a carico dei nuclei. Questo strato, di spessore variabile, segna la transizione tra la porzione più interna dell'epidermide, costituita da cellule vive metabolicamente attive, e quella più esterna, costituita da cellule morte. Nella porzione superiore di questo strato inizia la formazione dell'involucro corneo cellulare, che rappresenta il marcatore tipico del cheratinocita maturo. Lo strato corneo rappresenta il compartimento differenziativo terminale dell'epidermide (Plewig & Marples, 1970) ed è costituito da 15-20 strati di cheratinociti terminalmente differenziati chiamati corneociti o squame cornee. I corneociti si presentano

come cellule morte anucleate, strettamente cementate le une alle altre da una matrice extracellulare lipidica, con scarsi residui di organelli citoplasmatici, e un involucro cellulare notevolmente ispessito. Gli spazi intercorneocitari, che costituiscono il 10% dello strato corneo (Saurat et al., 1991), sono riempiti da lipidi esocitati dai cheratinociti. Il processo di cheratinizzazione descritto si svolge in maniera continua con una durata media di circa un mese (in condizioni non patologiche), e assicura il ricambio dei cheratinociti persi con la desquamazione (Fuchs E., 1990). I cambiamenti morfologici descritti sono determinati da modificazioni biochimiche che riflettono un programma di attivazione e inibizione sequenziale e/o sincronizzata di prodotti genici specifici (**Fig. 1**).

L'involucro corneo

L'involucro corneo è costituito per il 90% da proteine e per il 10% da lipidi (Swartzendruber et al., 1989). Alcuni di questi lipidi sono legati covalentemente alle proteine dell'involucro corneo, e formano lamelle lipidiche intercellulari che contribuiscono a svolgere la funzione di barriera protettiva dell'epidermide. Un modello strutturale dell'involucro corneo prevede un insieme di proteine legate covalentemente da legami isopeptidici (inter-proteina) e da ponti disolfuro. Le modifiche che si verificano nel cheratinocita durante il processo di maturazione terminale sono quindi dovute a variazioni dell'attività di enzimi specifici, quali le transglutaminasi, le protein-chinasi, le fosfatasi e le sulfidril-ossidasi, e all'espressione di proteine strutturali (K1 e K10), di proteine della matrice interfilamentosa (filaggrina) e di proteine dell'involucro corneo (involucrina, loricina, SPR e altre) (**Fig. 1**).

Le transglutaminasi

Le transglutaminasi (TG) sono una classe di enzimi specifici che svolge un ruolo essenziale nella formazione dei legami covalenti che costituiscono l'involucro corneo (Lorand & Graham, 2003). Infatti, la resistenza e l'insolubilità della cute, sono in gran parte dovute alla formazione di questi legami. Inoltre, le TG hanno la funzione di formare un ponte tra il citoscheletro e l'involucro corneo. Infatti, catalizzano la formazione di

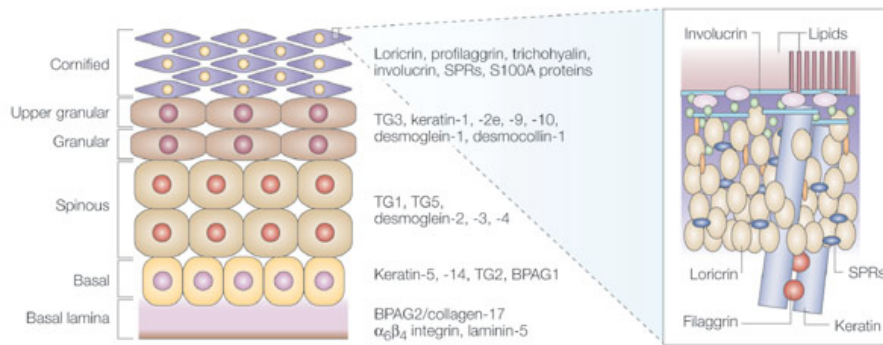


Figura 1. Il differenziamento epidermico. L'epidermide comprende quattro strati: basale, spinoso, granulare e corneo. Durante il differenziamento epidermico il cheratinocita subisce l'attivazione o l'inibizione di geni specifici di ogni strato differenziativo. L'involucro corneo è formato da una fitta rete di proteine strettamente addossate fra loro e tenute insieme per mezzo della formazione di legami isopeptidici crociati. Nell'involucro corneo predominano le proteine loricrina e SPR. (Candi et al., 2005)

legami covalenti isopeptidici tra il gruppo amminico laterale dei residui di lisina delle cheratine e i gruppi laterali dei residui di glutammina delle proteine dell'involucro corneo (legami ϵ -(γ -glutamil)lisina). Il risultato di tale processo è la notevole stabilità della rete dei filamenti intermedi cheratine/filaggrina e, quindi dell'involucro corneo. Le TG coinvolte nella formazione dell'involucro corneo sono la TG1, la TG3 e la TG5.

I filamenti intermedi di cheratina

I filamenti intermedi di cheratina (Keratin Intermediate Filaments, KIF), sono polimeri proteici che contribuiscono, insieme con i microtubuli e i microfilamenti, alla formazione dell'apparato citoscheletrico dei cheratinociti. Hanno un diametro di circa 10-15 nm e formano una struttura reticolare complessa che circonda il nucleo e si estende attraverso il citoplasma verso la periferia, mettendosi in relazione con le giunzioni di ancoraggio della cellula (Steinert et al., 1995). Attualmente si conoscono circa 30 cheratine che formano i KIF, codificate da geni distinti e classificate in base al grado di omologia in due tipi principali: le cheratine di tipo I, o cheratine acide ($4.5 < pI < 5.5$), comprendono undici cheratine espresse negli epitelii (K9-K20) e cinque nei capelli e nelle unghie (Ha1-Ha4, Hax); le cheratine di tipo II, o cheratine neutro-basiche ($6.5 < pI < 8$), comprendono otto cheratine epiteliali (K1-K8) e cinque nei capelli e nelle unghie (Hb1-Hb4, Hbx). Per formare i KIF, le cheratine si assemblano prima in eterodimeri obbligati tipo I e II, successivamente in coppie, tetrameri e multipli successivi, fino a formare i tipici filamenti del diametro di 10-15 nm.

A livello strutturale le cheratine presentano un dominio centrale a bacchetta (rod domain) di circa 310 aminoacidi, prevalentemente in α -elica, fiancheggiato da domini terminali altamente variabili in sequenza e struttura che determinano la capacità dei filamenti di associarsi tra loro e con altri componenti della cellula, determinando le proprietà funzionali di ciascuna cheratina. Infatti, alcune cheratine sono specializzate per formare lo strato protettivo esterno della cute, mentre altre rinforzano in modo specifico gli epitelii che subiscono cambiamenti di forma durante la morfogenesi.

Le cheratine sono espresse in maniera tessuto-specifica e differenziazione-specifica in tutti gli epitelii. L'espressione dei geni che codificano per le catene di tipo I e II è regolata in modo tale che in una cellula vengano prodotte solo una o poche coppie di determinate cheratine. Il numero e il tipo di queste coppie dipendono dalla posizione della cellula

nell'organo e dal suo particolare stadio di differenziamento. L'analisi della composizione dei filamenti intermedi ha evidenziato la presenza di quantità equimolari delle due cheratine costituenti il dimero fondamentale dei KIF. La cellula stabilisce questo equilibrio mediante un meccanismo a feedback negativo, che prevede che ciascun elemento della coppia stabilizzi il messaggero dell'altro e ogni eccesso sia invece rapidamente degradato. La presenza di una cheratina non induce tuttavia l'espressione della complementare. La quantità di cheratine, presenti nei diversi strati dell'epidermide, aumenta procedendo dall'interno verso l'esterno; nello strato basale esse costituiscono il 30% delle proteine totali e, dopo essersi associate ai granuli di cheratoialina nello strato granuloso, arrivano a costituire l'85% in quello corneo.

I filamenti intermedi citoplasmatici si associano sia alla membrana nucleare sia a quella plasmatica. L'involucro nucleare si comporta da centro di nucleazione per l'assemblaggio dei filamenti intermedi. Le modalità di associazione dei filamenti intermedi alla membrana cellulare variano a seconda del tipo cellulare. Le cellule degli epitelii stratificati presentano sulla membrana due tipi di placche specializzate per l'interazione con i filamenti cheratinici: i desmosomi, che consentono alle cellule di aderire le une alle altre e gli emidesmosomi, che ancorano la cellula alla membrana basale. Un elemento importante di queste strutture, in grado di mediare il legame tra i KIF e la placca desmosomiale, è la desmoplachina. La plectina è un'altra proteina della famiglia delle desmoplachine, localizzata a livello citoscheletrico, ma anche nei desmosomi e negli emidesmosomi.

Proteine dell'involucro corneo

Involucrina: L'involucrina è una proteina che normalmente partecipa all'assemblaggio dell'involucro corneo (Rice et al., 1977), anche se può essere espressa in altri tipi cellulari di origine non epiteliale. I residui aminoacidici più abbondanti nella proteina umana sono glicina e aspartato. Analogamente ad altre proteine precursori dell'involucro corneo, l'involucrina è costituita da sequenze aminoacidiche ripetute, che hanno subito arrangiamenti notevoli durante l'evoluzione (Eckert & Green, 1986). La struttura secondaria dell'involucrina è costituita principalmente da α -elica (Yaffe et al., 1992). L'involucrina è una delle prime proteine utilizzate dalle TG (TG1) durante l'assemblaggio dell'involucro corneo, creando un'impalcatura alla quale poi si uniscono altre proteine per formare

l'involucro corneo maturo (Simon et al., 1994). L'involucrina si trova in prossimità della membrana plasmatica cellulare. Poiché la membrana basale viene eliminata durante il differenziamento epidermico, l'involucrina potrebbe essere la proteina alla quale i lipidi che si trovano nello spazio extra-cellulare, soprattutto le ceramidi, si legano covalentemente per formare la superficie esterna lipidica dell'involucro corneo (Nemes et al., 1999a).

Loricrina: La loricrina è la proteina più abbondante dell'involucro corneo, rappresentando circa il 70-85% della massa proteica dello strato corneo. La loricrina è espressa tardivamente durante il differenziamento epidermico e sembra quindi avere la funzione di rafforzare l'involucro corneo nella sua porzione citoplasmatica. Studi strutturali di simulazione predicono che la proteina abbia una struttura non organizzata con diversi domini discreti: tre domini ricchi in glicina, serina e cisteina separati da brevi regioni aminoacidiche ricche in glutammina e domini N- e C-terminali ricchi in glutammina e lisina (Mehrel et al., 1990; Hohl et al., 1991) (**Fig. 2**). I residui di glicina sono separati da residui aromatici o da residui a lunga catena alifatica; tali residui possono associarsi attraverso interazioni idrofobiche, generando così la formazione di "omega loop". Le proteine SPR sembrano funzionare da proteine di collegamento tra le molecole di loricrina. Probabilmente la loricrina e le SPR si depositano su un'impalcatura preesistente di proteine che costituiscono l'involucro corneo immaturo. Tali proteine sono l'elafina, la cistatina A, l'involucrina, varie proteine desmosomiali e proteine leganti il calcio. Oltre ai peptidi loricrina-SPR-loricrina, sono stati identificati anche peptidi del tipo loricrina-cheratine e loricrina-filaggrina.

La loricrina è substrato delle TG ed è utilizzata da esse in modo sequenziale durante l'assemblaggio dell'involucro corneo: la TG1 e la TG5 utilizzano la loricrina per formare oligomeri di loricrina, attraverso la formazione di legami crociati intercatena; la TG3 di seguito aggiunge ulteriori legami, principalmente intra-catena, per compattare e rinforzare la struttura proteica che si è formata.

Nell'epidermide umana la loricrina neo-sintetizzata si accumula nei granuli di cheratoialina insieme alla profillaggrina. Nei roditori invece, esistono dei granuli distinti per le due proteine, i granuli L (loricrina) e i granuli F (profilaggrina). Si pensa che la fosforilazione possa essere un evento cruciale nella regolazione dell'accumulo della loricrina neo-sintetizzata in questi granuli.

SPR: Le proteine SPR (*Small Prolin Rich*) sono una famiglia di proteine (6-18 kDa) con sequenza aminoacidica simile, ricche in prolina (**Fig. 2**). Si suddividono in tre sottogruppi: SPR1 (2 proteine), SPR2 (10 proteine) e SPR3 (1 proteina). Le SPR hanno la stessa organizzazione strutturale: un dominio di testa (N-terminale) e di coda (C-terminale) in cui sono abbondanti i residui di glutammina e lisina, e un dominio centrale costituito da unità variabili (2-10) di sequenze peptidiche ripetute ricche in prolina che formano ripiegamenti β (Steinert et al., 1999). *In vitro* le SPR sono substrato delle TG che utilizzano i residui di glutammina e lisina che si trovano nei domini N- e C-terminali. Il contributo delle SPR all'assemblaggio e alla funzione dell'involucro corneo potrebbe essere simile a quello descritto per la loricrina. Infatti, la disorganizzazione strutturale delle SPR potrebbe contribuire a conferire elasticità all'involucro corneo mentre i legami catalizzati dalle transglutaminasi contribuiscono a determinare la resistenza meccanica.

Il contenuto relativo di loricrina ed SPR nell'epidermide può essere diverso nelle diverse aree del corpo dell'organismo e può dipendere dallo spessore dell'epidermide. Infatti, il rapporto SPR:loricrina può variare da <1:100 nell'epidermide sottile del tronco a 1:10 nell'epidermide del labbro, del palmo della mano e della pianta dei piedi, a >1:3 in quella dello stomaco anteriore dei roditori (Steinert et al., 1998). Questa variazione è alla base delle diverse proprietà di elasticità e resistenza meccanica dei diversi organi (**Fig. 2**).

Profilaggrina: La profilaggrina si trova inizialmente fosforilata e accumulata nei granuli di cheratoialina. Durante il processo di cheratinizzazione dell'epitelio la profilaggrina viene defosforilata, processata proteoliticamente e come filaggrina monomerica viene utilizzata dalle TG per prendere parte all'involucro corneo (Resing et al., 1985; Resing et al., 1993). L'organizzazione strutturale della filaggrina consiste in una serie di sequenze tandem ripetute cariche positivamente, essendo ricche di arginina e istidina, separate da peptidi di collegamento (Gan et al., 1990). È stato ipotizzato che queste regioni possano interagire con i residui carichi negativamente dei filamenti di cheratina (Mack et al., 1993). Inoltre i primi 80 residui aminoacidici della filaggrina contengono due domini leganti il calcio tipici delle proteasi e di altre proteine leganti il calcio (Markova et al., 1993). La struttura secondaria è conservata ed è formata da porzioni ripetute di tetrapeptidi che assumono una configurazione di ripiegamento β (Mack et al., 1993). Come ci si aspetterebbe da una proteina che funziona da

"collante" per i filamenti intermedi di cheratina, la filaggrina non è una proteina strutturalmente organizzata. *In vitro* la filaggrina ha la proprietà unica di aggregare i filamenti intermedi di cheratina a formare delle fasciole di filamenti molto salde tra loro, in cui le molecole di cheratina sono associate in modo estremamente ordinato (Steinert et al., 1981). L'effetto dell'azione della filaggrina determinerebbe il collasso del citoscheletro del cheratinocita che da ellissoidale assume una forma piatta con i fasci di filamenti di cheratina paralleli alla superficie esterna dell'epidermide. Nell'involucro corneo, la filaggrina viene degradata interamente a livello di singoli aminoacidi, questo determinerebbe un accumulo di aminoacidi idrofobici nella cellula essenziale per la ritenzione idrica che contribuisce alla flessibilità dell'involucro corneo.

Tricoialina: La tricoialina (THH), è la proteina principale dei granuli di tricoialina, presenti nello strato granuloso dell'epidermide e di altri tessuti specializzati quali il palato duro e le rilevance filiformi della lingua. Nonostante la presenza di numerosissimi residui carichi elettricamente, la THH ha una scarsissima solubilità in acqua ed è formata da una serie di sequenze peptidiche ripetute di 23-25 aminoacidi ricche in glutammina e lisina che funzionano come substrato per le TG. La THH forma una singola catena in α -elica, e contiene un domino di legame del calcio all'N-terminale (O'Keele et al., 1993; Misckhie et al., 1996).

La THH ha tre funzioni: (1) è una proteina della matrice interfilamentosa substrato delle TG; (2) svolge un ruolo di rinforzo dell'involucro corneo; in questo caso viene legata a numerose proteine incluse involucrina e SPR; (3) coordina i legami tra i filamenti intermedi e l'involucro corneo. Quindi la THH è essenziale per la resistenza meccanica dell'involucro corneo e per il coordinamento della rete dei filamenti intermedi.

L'adesione cellulare nell'epidermide

La lamina basale separa l'epidermide dal derma ed è composta essenzialmente da materiale extracellulare. Le cellule che compongono lo strato basale dell'epidermide aderiscono alla membrana basale attraverso

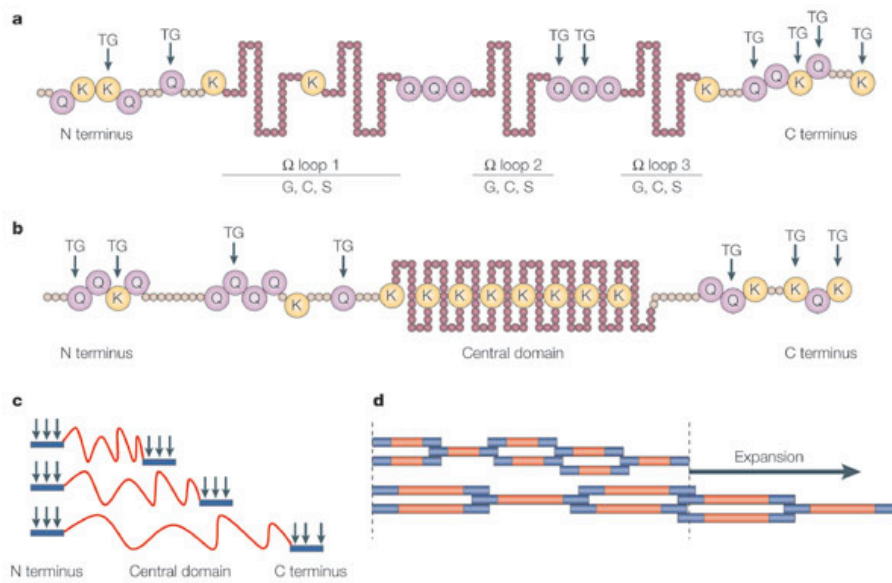


Figura 2. Struttura delle principali proteine dell'involucro corneo. (a) La loricrina ha tre Ω loop, domini non strutturati, altamente mobili, formati da residui di glicina (G), cisteina (C) e serina (S). Le frecce indicano i principali siti di legame crociato usati dalle transglutaminasi (TG) (glutamina (G) e lisina (K)). (b) Le proteine SPR (Small Proline Rich) hanno tre domini: uno N-terminale, uno centrale (8-16 ripetizioni di 8 residui) e uno C-terminale. Il dominio centrale non ha una struttura ordinata ed è altamente flessibile. Le frecce indicano i siti di legame crociato usati dalle TG. (c-d) Le strutture di loricrina e SPR sono dette "spring-like": i domini N e C-terminale danno resistenza meccanica, contenendo i principali siti di cross-linking usati dalle TG, mentre il dominio centrale flessibile è responsabile delle proprietà elastiche della cute. (Candi et al., 2005)

delle strutture precise, gli emidesmosomi, costituiti tra l'altro da integrine. Nell'epidermide, due tipi di giunzioni sono responsabili dell'adesione cellulare: le giunzioni aderenti (che collegano il citoscheletro di actina di cellule adiacenti) e i desmosomi (che collegano il citoscheletro di cheratina di cellule adiacenti) (Watt et al., 2002). Alcune proteine che fanno parte di questi complessi di adesione sono espresse in modo specifico durante il processo di cheratinizzazione, come la desmogleina-1, la desmocollina-1, l'envoplachina, la periplachina, la placofilina-1 e la corneodesmosina. Modifiche drastiche nella morfologia dei desmosomi avvengono durante la transizione tra lo strato granulare e lo strato corneo. Queste modifiche strutturali consistono nell'integrazione della porzione citoplasmatica del desmosoma nell'involucro corneo, accompagnata dalla formazione di una placca omogenea elettrondensa nella componente extracellulare. La coesione dei corneociti nello strato corneo, dipende proprio da questi cambiamenti nei desmosomi, che a questo punto prendono il nome di corneodesmosomi (Serre et al., 1991; Simon et al., 2001).

I due principali componenti dei corneodesmosomi sono la desmogleina-1 e la desmocollina-1, due glicoproteine appartenenti alla famiglia delle caderine. Un altro componente dei corneodesmosomi è la corneodesmosina, localizzata all'interno dei compartimenti extracellulari. La corneodesmosina è espressa nello strato spinoso e granuloso dell'epidermide. E' una proteina ricca in glicina e serina e sembra che, come per la loricrina e le cheratine, queste sequenze possano assumere una conformazione di omega-loop. Tali regioni sarebbero importanti per interagire con regioni di simile sequenza poste sulle cellule adiacenti.

Ruolo delle proteasi nel differenziamento epidermico

La cheratinizzazione richiede l'attivazione di molte proteasi epidermiche, le quali intervengono in almeno tre processi durante il differenziamento epidermico: (1) attivazione proteolitica di proteine ed enzimi importanti per l'assemblaggio dell'involucro corneo; (2) perdita del nucleo e dei mitocondri; (3) degradazione dei corneodesmosomi.

Alcune TG, tra cui la TG1, prima di poter procedere all'assemblaggio dell'involucro corneo, devono essere attivate proteoliticamente. Nel caso della TG1, questa attivazione avviene probabilmente attraverso l'azione della m-calpain, della catepsina D o della furina (Kim & Bae, 1998; Egberts et al., 2004). In modo analogo la filaggrina è substrato di molte proteasi, tra

cui PEP1, calpaina, furina e le proteasi a serina matriptasi. Esistono almeno tre classi di proteasi intracellulari: le proteasi lisosomiali, le calpaine e le caspasi, e varie proteasi extracellulari.

Le proteasi lisosomiali: I lisosomi contengono un numero elevato di idrolasi. Non è noto come vengano attivati gli enzimi lisosomiali durante il differenziamento epidermico, così come non è noto il meccanismo con il quale vengono degradati gli organelli nelle fasi terminali di formazione dell'involucro corneo.

Le calpaine: L'aumento di calcio durante il differenziamento epidermico, sia inter- sia intra-cellulare, regola l'attività di queste proteasi calcio-dipendenti. La μ -calpaina (I) e la m-calpaina (II), che richiedono per la loro attivazione concentrazioni micromolare e millimolare di calcio, rispettivamente, sono presenti negli strati soprabasali dell'epidermide. Inibitori sintetici della μ -calpaina (I) inibiscono il processamento della TG1 e della profillaggrina (Miyachi et al., 1986; Kim & Bae, 1998).

Altre serin-proteasi calcio-dipendenti sono quelle appartenenti alla famiglia delle subtilisina protein-convertasi (SPC), che sono coinvolte nelle vie di secrezione. Quattro membri di questa famiglia sono espressi nell'epidermide. Tra questi è presente la furina (SPC1) che viene attivata negli ultimi stadi del differenziamento epidermico. La furina, *in vitro*, rimuove la parte N-terminale della profilaggrina.

Le caspasi: La caspasi-14 è espressa negli strati soprabasali dell'epidermide. L'enzima non è coinvolto nell'apoptosi, come la maggior parte degli altri membri della famiglia, ma è importante nella transizione dallo strato granulare allo strato corneo durante il differenziamento (Lippens et al., 2000; Denecker et al., 2007).

Le proteasi extracellulari: La corneodesmosina, la desmogleina-1 e la desmocollina-1 sono proteine adesive della parte extracellulare dei corneodesmosomi. La degradazione di queste proteine è necessaria per il processo di desquamazione. Due proteasi a serina della famiglia della callicreina sono gli enzimi responsabili di questa degradazione: l'enzima chimotriptico dello strato corneo (SCCE) e l'enzima triptico dello strato corneo (SCTE) (Caubet et al., 2004). Questi enzimi agiscono digerendo le regioni ricche in glicina delle proteine dei corneodesmosomi (Ekholm et al.,

2000). Altre proteasi identificate nell'involucro corneo sono la catepsina D e la tiolproteasi dello strato corneo (SCTP) o catepsina L2.

La componente lipidica dell'involucro corneo

La componente più esterna dell'involucro corneo è costituita dai lipidi. I lipidi sintetizzati dall'epidermide svolgono la funzione di barriera e limitano la perdita di liquidi. La maggior parte dei lipidi è costituita dalle ceramidi, dal colesterolo, dagli acidi grassi, e dagli esteri del colesterolo che formano lamelle tra i corneociti dello strato corneo dell'epidermide. Questi lipidi sono sintetizzati dai cheratinociti e vengono accumulati in granuli detti granuli lamellari o corpi di Odland, che nella parte superiore dello strato granuloso si fondono con la membrana plasmatica e riversano il loro contenuto nello spazio extracellulare (Bouwstra et al., 2003; Madison et al., 2003). Dopo l'estrusione dei lipidi nell'ambiente extracellulare, avvengono numerose modifiche a opera di un gruppo di idrolasi acide che si trovano anch'esse nello spazio extracellulare (Freinkel et al., 1985; Grayson et al., 1985; Menon et al., 1992). Tra gli enzimi coinvolti nella trasformazione dei lipidi extracellulari, troviamo: la β -glucocerebrosidasi, la sfingomielinasi acida e la fosfolipasi A2 (Holleran et al., 1994; Jensen et al., 1999; Schumuth et al., 2000). Studi eseguiti al microscopio elettronico hanno dimostrato che i lipidi sono organizzati in membrane impilate le une sulle altre che riempiono lo spazio extracellulare (Elias et al., 1975), mentre esperimenti di biofisica hanno evidenziato che nelle lamelle extracellulari i lipidi possono presentarsi in fase di gel o in fase liquida (Forslind et al., 1994).

Un aspetto importante e non completamente risolto riguarda il meccanismo molecolare attraverso il quale i lipidi delle lamelle interagiscono con le proteine dell'involucro corneo. Le idrossiceramidi a catena lunga, che sono presenti sulla superficie extracellulare dell'involucro corneo, potrebbero essere legati covalentemente attraverso legami estere alla superficie esterna dell'involucro corneo (Goldstein et al., 2003). A conferma di tale ipotesi, la TG1 può catalizzare la reazione di esterificazione di una idrossiceramide a catena lunga con alcuni residui aminoacidici dell'involucrina (Nemes et al., 1999b; Kalinin et al., 2002).

Modelli animali con difetti nella formazione dell'involucro corneo

Proliferazione e differenziamento dei cheratinociti

Topi knockout per p63 (p63^{-/-}): p63 è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia di p53. p63 è espresso in due isoforme principali, trascritte da due diversi promotori. La differenza risiede nella porzione N-terminale: l'isoforma TAp63 contiene il dominio di transattivazione (TA), mentre l'isoforma Δ Np63 ne è priva. Δ Np63 agisce come dominante negativo e inibisce la transattivazione da parte delle isoforme TAp63 e di p53 (Yang et al., 1998). Inoltre, ognuna delle due isoforme è espressa in tre differenti varianti di splicing (α , β , γ) che differiscono tra di loro solo per quello che riguarda la porzione C-terminale della proteina. L'isoforma α (completa) contiene un dominio per l'interazione tra le proteine, denominato SAM (Sterile Alpha Motif), tipico dei processi di sviluppo, che media il legame con altre proteine (Thanos & Bowie, 1999).

Lo sviluppo di modelli animali p63^{-/-} è stato importante per determinare la funzione di questa proteina. Questi animali hanno degli evidenti difetti nello sviluppo, che comprendono una pressoché completa assenza di epiteli squamosi pluristratificati, tra cui la cute, e dei loro annessi, inclusi ghiandole salivari, mammarie e lacrimali. A causa della mancanza di una barriera epidermica, questi animali muoiono a poche ore dalla nascita per disidratazione (Yang et al., 1999; Mills et al., 1999). Inoltre, altri difetti tipici dei topi p63^{-/-}, sono l'assenza di arti e difetti dello sviluppo craniofaciale, come palatoschisi e assenza di denti. Il mancato sviluppo degli arti è correlato alla incapacità degli embrioni knockout di sviluppare e/o differenziare correttamente la cresta apicale ectodermica, la regione distale di ciascun arto contenente le cellule staminali, responsabili dell'accrescimento dell'organo (Yang et al., 1999; Mills et al., 1999). Tutto ciò è in accordo con l'identificazione di malattie genetiche umane causate da mutazioni di p63.

Sebbene i geni regolati a valle da p63 e i meccanismi molecolari che li regolano non siano stati ancora identificati, appare tuttavia evidente che p63 regoli il compartimento delle cellule staminali epiteliali e le prime fasi differenziali, molto prima dello sviluppo dell'involucro corneo (**Fig. 3**). Numerosi sono i putativi geni target di p63 identificati (Viganò et al., 2006), ma solo per pochi di questi è stato dimostrato il loro coinvolgimento nello sviluppo epidermico *in vivo*.

In cheratinociti proliferanti p63 reprime p21 e 14-3-3 σ , due geni richiesti

per il differenziamento terminale dei cheratinociti. Quindi, la ridotta capacità proliferativa dei topi $p63^{-/-}$ può essere causata dall'aumentata espressione di p21 (Westfall et al., 2003). Un altro pathway che gioca un ruolo cruciale nello sviluppo epidermico è mediato da Notch1. Tra p63 e Notch1 esiste un cross-talk: il segnale di Notch1 è in grado di sopprimere l'espressione di p63, mentre l'attività di p63 inibisce l'abilità di Notch1 nel promuovere l'arresto del ciclo cellulare e il differenziamento epidermico (Nguyen et al., 2006; Okuyama et al., 2007). Infatti, nei cheratinociti Notch1 induce l'arresto del ciclo cellulare associato all'induzione di p21. D'altra parte l'induzione di p21 viene soppressa dalla presenza di p63. Sebbene numerose evidenze indicano che p63 funge da modulatore della trascrizione Notch1-dipendente e transattivi il ligando di Notch1 Jagged-1 (Sasaki et al., 2002), il ruolo di p63 nel modulare il segnale di Notch1 non è del tutto chiaro.

La chinasi $IKK\alpha$ (IkB kinase- α) è un altro gene target di p63. Come p63, $IKK\alpha$ è essenziale per lo sviluppo dell'epidermide (Sil et al., 2004). Il fenotipo simile tra il topo $p63^{-/-}$ e $IKK\alpha^{-/-}$ suggerisce che $IKK\alpha$ possa essere un target di p63. Infatti, p63 regola $IKK\alpha$ trans-attivandolo direttamente e indirettamente attraverso l'induzione di Ets-1 e GATA-3 che legano il promotore di $IKK\alpha$ (Candi et al., 2006) (**Fig. 3**). GATA-3 è un importante mediatore dello sviluppo della pelle e del pelo (Kaufman et al., 2003), anche se la sua specifica funzione nello sviluppo e differenziamento dell'epidermide non è stata ancora stabilita. Altri geni epidermici regolati da p63 sono la proteina di adesione cellulare Perp (Ihrie et al., 2005), la cheratina-14 (Candi et al., 2006), l'envoplachina (Carrol et al., 2006) e il componente degli emidesmosomi BPAG-1 (Osada et al., 2005) (**Fig. 3**).

Segnali per il differenziamento

Esistono molti geni implicati nel differenziamento dei cheratinociti, quelli che seguono, di cui sono stati generati degli animali knockout, si sono rivelati particolarmente importanti.

Topi knockout per PTEN ($PTEN^{-/-}$): La fosfatasi multifunzionale PTEN regola la via del fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3) nella cascata di trasduzione del segnale di PI3K, in risposta a fattori di crescita quali l'EGF, il fattore di crescita degli epatociti e IGF-1 (Toker et al., 1997). Il PIP3 attiva a sua volta la serina-treonina chinasi (Akt/PKB) che promuove la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Di conseguenza PTEN agisce come un soppressore tumorale (Li et al., 1997).

Topi PTEN^{-/-} muoiono durante le prime fasi embrionali dello sviluppo, precludendo così l'analisi del ruolo svolto da PTEN negli organi adulti (Suzuki et al., 1998). In topi in cui PTEN è selettivamente deletato nello strato basale dell'epidermide (topi K5-Cre-PTEN^{fllox/fllox}), la cute appare rugosa a causa dell'iperplasia e più del 90% degli animali muore per problemi di nutrizione dovuti all'ipercheratosi dell'esofago, che ostacola la deglutizione (Suzuki et al., 2003). Questi animali sviluppano anche tumori spontanei, principalmente papillomi squamosi, che in seguito diventano carcinomi squamosi.

I cheratinociti PTEN^{-/-} mostrano una marcata proliferazione in risposta al trattamento con EGF *in vitro* e sono più resistenti all'apoptosi. La fosforilazione di Akt/PKB e di MAPK è significativamente elevata nei cheratinociti PTEN^{-/-} trattati con EGF. L'insorgenza di tumori nella cute di questi topi è dovuta principalmente all'iperproliferazione cellulare e/o alla resistenza all'apoptosi dovuta a PI3K e Akt/PKB.

Topi knockout per il complesso AP: AP-1 (Proteina Attivatrice 1) è un fattore di trascrizione formato da omo- o etero-dimeri di membri delle famiglie di proteine Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, e Fra-2), Jun (cJun, JunB, e JunD), ATF e Maf (Eferl & Wagner, 2003). Le proteine delle famiglie Fos e Jun fungono da fattori di trascrizione dimerici legando dei siti di legame ad AP-1 presenti nei promotori e nelle regioni enhancer di numerosi geni di mammifero (Curran & Franza, 1988). Sebbene la loro struttura sia molto simile, i diversi membri delle famiglie Jun e Fos si differenziano significativamente per le loro proprietà di legame al DNA e di attivazione trascrizionale, suggerendo specifiche funzioni nella regolazione genica per ciascun dimero AP-1 (Shaulian & Karin, 2002). Ap-1, agendo a valle di pathway come MAPK, TGF- α e Wnt, è uno dei fattori chiave nel tradurre gli stimoli esterni in cambiamenti dell'espressione genica. L'attività di AP-1 è indotta da una miriade di agenti, quali fattori di crescita, neurotrasmettitori, ormoni peptidici, infezioni batteriche e virali, così come da diversi stress fisici e chimici.

Esperimenti di perdita o di guadagno di funzione nel topo, dimostrano il ruolo centrale di AP-1 in vari processi incluso proliferazione cellulare, differenziamento, trasformazione oncogenica e apoptosi (Jochum et al., 2001). Le proteine AP-1 giocano un ruolo importante anche durante il differenziamento terminale dei cheratinociti epidermici. È ben noto che AP-1 regola molti geni codificanti per proteine essenziali nell'omeostasi della pelle (Angel et al., 2001). Questi includono la TG 1 (Liew & Yamanishi,

1992), diverse citocheratine, come K1 (Lu et al., 1994), K5 (Casatorres et al., 1994), K14, e K17 (Ma et al., 1997), come anche proteine strutturali quali involucrina (Welter et al., 1995), loricrina (DiSepio et al., 1995), e profilaggrina (Jang et al., 1996). Risulta però difficile speculare sulle funzioni di AP-1 nella cute. Infatti, se da una parte l'inattivazione di alcune proteine AP-1 non risulta in un chiaro fenotipo epidermico (Angel et al., 2001), dall'altra è stato dimostrato che la perdita di JunB e Fra-1 porta a letalità embrionale (Eferl & Wagner, 2003). Dati interessanti arrivano dall'inattivazione condizionale di cJun nell'epidermide di topo, dimostrando che questa proteina gioca un ruolo essenziale nel regolare la chiusura delle palpebre, la proliferazione dei cheratinociti e lo sviluppo di tumori nella cute, attraverso il "signaling" del recettore dell'EGF (EGFR) (Li et al., 2003; Zenz et al., 2003). Inoltre, l'espressione individuale delle proteine AP-1 è implicata nelle interazioni mesenchimali-epiteliali citochine-mediate nella pelle. (Szabowski et al., 2000). Alterazioni nell'omeostasi tissutale e un'espressione aberrante delle citochine sono correlate con malattie umane come la psoriasi.

Topi knockout per Notch1 (Notch1^{-/-}): Notch1 rappresenta uno dei quattro membri appartenenti alla famiglia di recettori transmembrana Notch. Dopo il legame con un ligando (Delta-like 1/3/4, Jagged 1/2) Notch1 subisce un taglio proteolitico, con la conseguente liberazione della porzione citosolica del recettore, l'ICD (Intra-Cellular Domain). L'ICD libero trasloca nel nucleo dove si va ad associare con il fattore di trascrizione RBP-J, che in questo modo si converte da repressore ad attivatore trascrizionale (Mumm & Kopan 2000). Tra i bersagli attivati da Notch1, vanno menzionati i membri della famiglia di repressori trascrizionali HES (Hairy Enhancer of Split) e HERP (HEs-related Repressor Protein) (Iso et al., 2003).

La via di trasduzione di Notch1 regola il destino delle cellule pluripotenti durante lo sviluppo, il rinnovamento delle cellule staminali e il differenziamento nei tessuti adulti. Nella pelle Notch1 è essenziale per il differenziamento dei cheratinociti (**Fig. 4**). Sebbene topi Notch1^{-/-} muoiono durante l'embriogenesi, il suo ruolo nel differenziamento epidermico può essere studiato in topi in cui la sua espressione viene alterata specificamente nei cheratinociti. Topi in cui Notch1 è costitutivamente attivato nell'epidermide mostrano un aumento dei compartimenti differenzianti (K1-positivi) (Blanpain et al., 2006). Al contrario, una riduzione dei compartimenti differenzianti si osserva in topi in cui Notch1 è specificamente deleta nei cheratinociti (Rangarajan et al., 2001). Questi

animali mostrano un'epidermide iperproliferativa, con espansione delle cellule basali proliferanti, il che porta a classificare Notch come oncosoppressore. Inoltre il pathway di Notch/RBP-J funziona nel mantenimento e differenziamento terminale del follicolo pilifero (Vauclair et al., 2005).

Notch1 induce l'espressione del regolatore del ciclo cellulare p21 (Rangarajan et al., 2001). L'aumento di p21 induce i cheratinociti proliferanti a promuovere l'arresto del ciclo cellulare e aiuta a iniziare il differenziamento terminale. Inoltre è stato dimostrato che Notch1 attiva la caspasi-3, portando alla riduzione della proliferazione e all'aumento del differenziamento dei cheratinociti embrionali attraverso l'attivazione di PKC- δ (Okuyama et al., 2004). Come descritto in precedenza il funzionamento di Notch1 coinvolge un "cross-talk" con il fattore trascrizionale p63. Infatti, la proliferazione o il differenziamento dei cheratinociti viene determinato da un accurato equilibrio tra i livelli intracellulari di queste due proteine. Un altro "cross-talk" esiste tra il pathway di Notch1 e il segnale sia di Wnt sia di Sonic hedgehog (Shh). Notch1 reprime il segnale sia di Wnt sia di Shh, entrambi coinvolti nella regolazione della tumorigenesi. Nella pelle Notch1^{-/-} l'attivazione di Wnt e Shh causa nel topo lo sviluppo di carcinoma delle cellule basali e carcinoma delle cellule squamose (Nicolas et al., 2003).

Formazione dello strato corneo

Sorprendentemente solo un modello animale mostra gravi anomalie nella formazione dello strato corneo.

Topi knockout per TG1 (TG1^{-/-}): Le TG svolgono un ruolo molto importante durante la formazione dello strato corneo (Lorand & Graham, 2003). Nonostante ci sia una certa ridondanza in questo sistema, come suggerito da modelli animali quali topi knockout per la loricina e l'involucrina con fenotipo modesto, i topi TG1^{-/-} confermano che questo enzima è essenziale per il corretto assemblaggio dello strato corneo. Infatti, questi topi muoiono a poche ore dalla nascita per disidratazione, dovuta essenzialmente all'incapacità dell'epidermide di svolgere la sua funzione di barriera contro la perdita di liquidi (Matsuki et al., 1998).

Tuttavia due grandi domande su questo modello animale restano ancora senza una risposta; il primo quesito è sul perché l'assenza della TG1 sia letale nel topo ma non nell'uomo, mentre il secondo riguarda la motivazione

della ridondanza nel numero dei membri della famiglia delle TG espresse nella pelle.

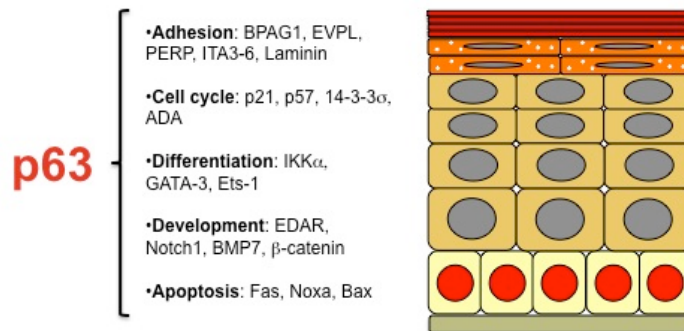


Figura 3. Ruolo di p63 nell'epidermide. Sono stati effettuati numerosi studi per identificare i geni target di p63. Nella figura vengono elencati in modo semplificato i target di p63 che sono stati validati sperimentalmente.

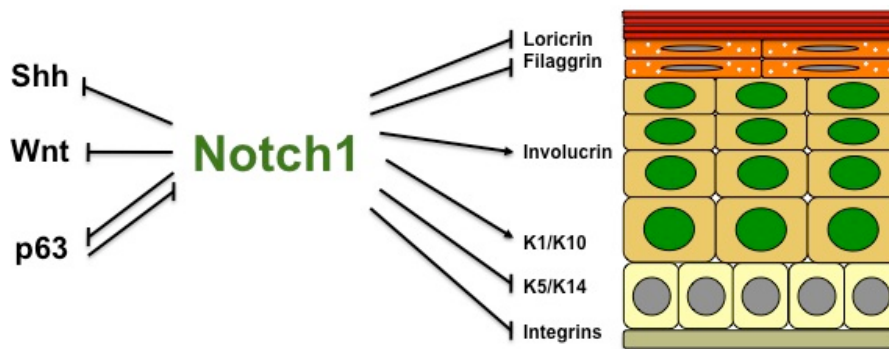


Figura 4. Ruolo di Notch1 nell'epidermide. Notch1 induce l'espressione della chertina-1 e dell'involucrina (marcatori precoci del differenziamento) e previene l'induzione della filaggrina e della loricrina (marcatori tardivi del differenziamento), che avviene in una fase di differenziamento successiva. p63 e Notch1 reprimono la trascrizione l'uno dell'altro. Inoltre, Notch1 reprime i pathway di Wnt ed Shh.

L'ubiquitilazione

Le cellule eucariotiche hanno evoluto due principali strategie per regolare la stabilità e la degradazione delle proteine: la via di degradazione dei lisosomi e quella dei proteasomi. I lisosomi sono responsabili della demolizione delle proteine extracellulari e di membrana internalizzate mediante endocitosi, mentre i proteasomi sono deputati alla degradazione proteolitica delle proteine intracellulari poli-ubiquitinate (Ciechanover, 1994).

Prima della scoperta del sistema proteolitico ubiquitina-proteasoma-dipendente, i lisosomi sono stati considerati il principale apparato deputato all'eliminazione delle proteine all'interno del citoplasma. I lisosomi sono delle vescicole citoplasmatiche delimitate da una membrana monostratificata, che racchiudono più di quaranta tipi di proteasi e di altri enzimi idrolitici, come le nucleasi, le glicosidasi, le lipasi, le fosfolipasi e le fosfatasi. Tutti questi enzimi sono idrolasi, la cui attività ottimale richiede un ambiente acido che viene mantenuto dal lisosoma intorno a pH 5. La compartimentalizzazione di questi enzimi proteolitici previene la degradazione incontrollata delle proteine cellulari. Il ruolo chiave della degradazione ubiquitina-proteasoma-dipendente nella regolazione della stabilità e dell'abbondanza di numerose proteine intracellulari, e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, è attualmente ampiamente riconosciuto. Tuttavia l'ubiquitilazione non rappresenta una modificazione post-traduzionale che controlla in maniera univoca la degradazione proteasoma-dipendente delle proteine. Infatti, oltre al suo ruolo nel marcare una molecola per il riconoscimento da parte del proteasoma, essa regola anche la degradazione delle proteine che vengono indirizzate al lisosoma. Inoltre è stata implicata nella regolazione di altre funzioni biologiche.

L'ubiquitina

L'ubiquitina, scoperta nel 1975 come una proteina di 8.5 kDa con una funzione sconosciuta, deve il suo nome al fatto che è espressa in modo ubiquitario in tutte le cellule eucariotiche. È una proteina altamente conservata, ma è assente sia nei batteri sia negli archea.

Il processo di ubiquitilazione è stato inizialmente caratterizzato in estratti cellulari come un sistema proteolitico ATP-dipendente, nel quale un polipeptide stabile al calore chiamato APF-1 (ATP-dependent Proteolysis

Factor 1) veniva legato covalentemente a una proteina substrato in maniera ATP- e Mg^{2+} -dipendente. Multiple molecole di APF-1 si legavano a un singolo substrato attraverso un legame isopeptidico e successivamente questi coniugati venivano rapidamente degradati, con il rilascio di APF-1 libero (Hershko et al., 1979; Ciechanover et al., 1980; Wilkinson et al., 1980). Questa proteina è stata identificata come ubiquitina ed è stato chiarito che il gruppo carbossilico della glicina C-terminale dell'ubiquitina (Gly76) è coinvolto nel legame con il substrato.

I procarioti non hanno una molecola funzionalmente correlata o analoga all'ubiquitina, sebbene possiedano proteine che mostrano un ripiegamento simile. Un buon esempio è la proteina di *E. coli* ThiS, un trasportatore dello zolfo, la quale condivide solo il 14% della sequenza aminoacidica con l'ubiquitina, ma possiede il suo tipico ripiegamento, suggerendo che l'ubiquitina eucariotica e la proteina procariotica ThiS si siano evolute da una proteina ancestrale comune. (Wang et al., 2001). Durante l'evoluzione sono state generate diverse proteine eucariotiche che condividono il ripiegamento dell'ubiquitina, le quali vengono chiamate UBL (UBiquitin-Like). Oltre al ripiegamento, le proteine UBL condividono con l'ubiquitina la capacità di essere legate attraverso un legame isopeptidico, formato tra la glicina terminale della proteina e un gruppo amminico della proteina target. Generalmente il gruppo amminico nella proteina target è dato da un residuo di lisina, ma è stata descritta anche l'ubiquitilazione N-terminale (Bloom et al., 2003). Inoltre, le proteine UBL mostrano una stretta omologia di sequenza con l'ubiquitina: per esempio, Sumo-1 è per il 20% identica all'ubiquitina umana e per il 52% identica alla proteina Sumo di lievito (Smt3) (Su & Lau, 2009). Questa forte conservazione di sequenza interspecie indica che la funzione biologica di queste proteine è conservata. Le proteine UBL meglio caratterizzate, Sumo e Nedd8, sono presenti in tutti gli eucarioti, mentre altre sono presenti solo nei mammiferi.

Sebbene rimanga molto da capire, gli studi effettuati negli ultimi anni hanno chiarito in parte le funzioni delle proteine UBL, come per la sumoilazione, che regola il trasporto nucleo-citoplasmatico e il ciclo cellulare attraverso la modulazione della localizzazione e/o dell'attività dei suoi substrati (Su & Lau, 2009). Inoltre, è stata dimostrata la presenza di un cross-talk tra i membri della famiglia dell'ubiquitina. Per esempio Nedd8, modifica una classe di enzimi coinvolti nell'ubiquitilazione, stimolando questi enzimi ad associare l'ubiquitina ai substrati (Hochstrasser, 2000).

La funzione meglio caratterizzata dell'ubiquitilazione e quella della degradazione delle proteine, i livelli delle quali sono regolati sia

costitutivamente sia in risposta a cambiamenti dell'ambiente cellulare. Il ruolo cruciale di questa modificazione può essere osservata in una miriade di processi come ciclo cellulare, proliferazione, differenziamento, biogenesi degli organelli, trasporto delle proteine, apoptosi, processamento degli antigeni, infiammazione e riparazione del DNA, spiegando come l'ubiquitina può essere coinvolta in così tante malattie (Petroski, 2008). Il segnale canonico di ubiquitilazione, una catena di poli-ubiquitine creata mediante legami tra la glicina terminale di una molecola di ubiquitina (Lys76) e un residuo di lisina in posizione 48 (Lys48) di un'altra, viene riconosciuta dalla proteasi multisubunità chiamata proteasoma 26S come un segnale di degradazione di una proteina target (Chiechanover, 1998). L'aspetto più affascinante di questo processo è quello che questa modificazione consiste in un rapido e fine metodo per controllare l'espressione di una proteina, in quei processi che richiedono una sua rapida e selettiva degradazione, per esempio nella transizione tra le fasi del ciclo cellulare.

L'ubiquitina possiede sette residui di lisina. Oltre alla Lys48, altri quattro residui (Lys6, Lys11, Lys29 e Lys63) possono dar luogo alla formazione di catene di poli-ubiquitina (Johnson et al., 1995; Schneel & Hicke, 2003) (**Fig. 5**). Non tutte le modificazioni ottenute tramite il legame con l'ubiquitina indicano che la proteina debba essere degradata: ci possono essere eventi non proteolitici e reversibili come cambiamenti nell'attività della proteina, interazioni proteina-proteina e localizzazione subcellulare. Inoltre l'ubiquitilazione non avviene sempre tramite legame di una catena di ubiquitine: il legame di una singola ubiquitina a una proteina target è noto come mono-ubiquitilazione, la quale interviene nella regolazione di diversi processi, quali funzione degli istoni, trascrizione, endocitosi e traffico di membrana (Hicke, 2001; Katzmann et al., 2002). In particolare, il legame non proteolitico con la Lys6 e la Lys11 è correlato con la patogenesi di malattie neurodegenerative (Cripps et al., 2006; Bennett et al., 2007), mentre singola o multipla mono-ubiquitilazione dei recettori di membrana cellulare porta alla loro internalizzazione e degradazione endosomiale (Di Fiore et al., 2003).

L'ubiquitilazione è un processo dinamico e reversibile: nelle cellule sono presenti degli enzimi deubiquitilanti, responsabili della rimozione dell'ubiquitina dalle proteine e della distruzione delle catene di poli-ubiquitina. Questi enzimi sono importanti anche per il processo di maturazione dell'ubiquitina. Infatti, queste piccole proteine sono codificate in geni multipli e tradotte come proteine di fusione sia con altre molecole di

ubiquitina che come componenti N-terminali di due piccole subunità ribosomali, quindi processate da ubiquitina carbossi-terminale idrolasi, per avere l'ubiquitina matura (Finley et al., 1989).

Biochimica del processo di ubiquitilazione: gli enzimi E1, E2 ed E3

Le reazioni biochimiche che avvengono durante il processo di ubiquitilazione sono catalizzate da tre classi di enzimi, chiamati E1, E2 ed E3 (**Fig. 6**). Nella prima reazione, un enzima di attivazione dell'ubiquitina (E1) forma un legame tioestere con la glicina carbossi-terminale dell'ubiquitina in maniera ATP-dipendente; quindi, un enzima di coniugazione dell'ubiquitina (E2), riceve l'ubiquitina da E1 attraverso una reazione di trans-esterificazione, che coinvolge se stesso e il carbossi-terminale dell'ubiquitina. In fine, l'ultimo enzima, una ubiquitina ligasi (E3), catalizza il trasferimento dell'ubiquitina dall'enzima E2 al gruppo ϵ -amminico del residuo di lisina della proteina target (Fang & Weissman, 2004) (**Fig. 6**).

Esistono più enzimi E2 che E1 e più enzimi E3 che E2, quindi, per ogni tappa, il numero di proteine che potenzialmente possono essere coinvolte aumenta. L'enzima E3, da solo o in combinazione con l'enzima E2, determina la specificità di riconoscimento del substrato. A differenza delle cellule di lievito nelle quali esiste un unico enzima E1, le cellule di mammifero hanno evoluto almeno dieci diversi enzimi in grado di attivare l'ubiquitina. La reazione catalizzata dall'enzima E1 incomincia con il suo legame sequenziale al complesso MgATP e all'ubiquitina, che determina la formazione di un intermedio ubiquitina-adenilato, che servirà come donatore di ubiquitina al residuo di cisteina del suo sito attivo. L'ubiquitina legata al gruppo tiolo viene successivamente trasferita all'enzima E2. E1 si trova nel nucleo e nel citosol ed è associato al citoscheletro (Grenfell et al., 1994). Inoltre viene fosforilato nelle cellule di mammifero dalla chinasi ciclina-dipendente Cdc2 (Nagai et al., 1995), dimostrando il ruolo cruciale dell'ubiquitilazione nel controllo del ciclo cellulare.

Nel lievito esistono 11 enzimi E2, mentre negli organismi superiori il numero è significativamente maggiore. Nelle cellule di mammifero sono state descritte fino a oggi almeno 100 diversi enzimi E2. Tutti questi enzimi contengono una cisteina in un dominio centrale conservato di circa 150 residui aminoacidici chiamato "dominio UBC". La cisteina conservata è richiesta per l'attività enzimatica e accetta l'ubiquitina da E1 per formare un

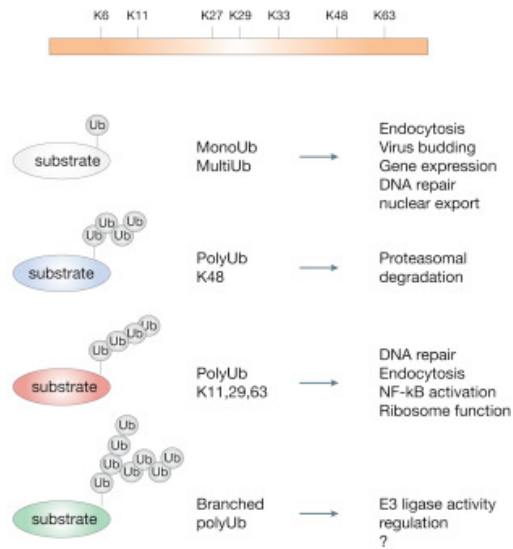


Figura 5. Meccanismi di modificazione delle proteine da parte dell'ubiquitina. La sequenza aminoacidica dell'ubiquitina contiene sette lisine utilizzabili in diversi tipi di catene, con varie, ma a volte simili conseguenze. (Modificato da Woelk et al., 2007)

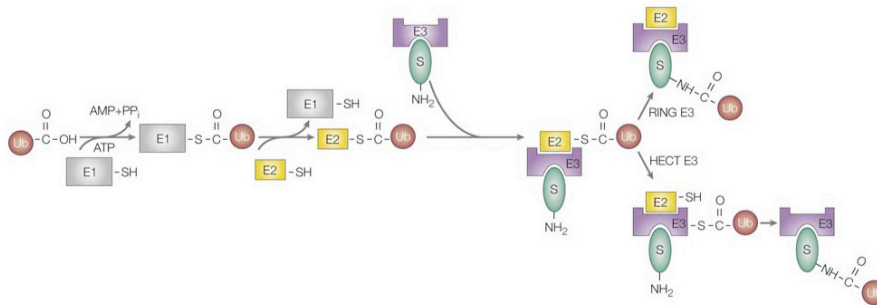


Figura 6. L'ubiquitilazione è un processo a più tappe. L'enzima di attivazione dell'ubiquitina (E1) forma un legame tioestere con la glicina carbossi-terminale dell'ubiquitina in maniera ATP-dipendente; l'enzima di coniugazione dell'ubiquitina (E2) riceve l'ubiquitina da E1 attraverso una reazione di trans-esterificazione, che coinvolge se stesso e il carbossi-terminale dell'ubiquitina; l'enzima ubiquitina ligasi (E3), catalizza il trasferimento dell'ubiquitina dall'enzima E2 al gruppo e-amminico del residuo di lisina della proteina target. (Fang & Weissman, 2004)

tioestere. Alcuni E2 hanno delle estensioni amino- o carbossi-terminali che possono regolare l'associazione con l'enzima E3, l'attività intrinseca dell'enzima e il riconoscimento del substrato, mentre altre hanno delle inserzioni nel dominio UBC (Pickart, 2001). Allo stesso modo, la composizione aminoacidica delle regioni di contatto tra E2 ed E3 può influire nell'interazione produttiva dei due enzimi. Basandosi sul numero delle potenziali/effettive sequenze per E3, può essere predetto che gli enzimi E2 funzionano con diversi enzimi E3. *In vitro*, molti E3 hanno la capacità di funzionare con vari E2, anche se il numero di appaiamenti è chiaramente ristretto. Il legame non covalente E2/ubiquitina è generalmente basso, indicando che E1 gioca un ruolo chiave nel legame di E2 con l'ubiquitina.

La più straordinaria caratteristica del processo di ubiquitilazione è il gran numero di substrati che coinvolge e di funzioni biologiche in cui interviene, aspetto strettamente correlato al grande numero di enzimi E3 esistenti. Infatti, il riconoscimento specifico del target viene compiuto da questa classe di enzimi, attraverso il legame diretto della proteina. Questo prevede che E3 riconosca un motivo sul substrato che lo marca per l'ubiquitilazione, noto come segnale di ubiquitilazione. Per alcuni segnali di ubiquitilazione è necessaria una modificazione chimica o conformazionale affinché questi acquisiscano la capacità di interagire con l'enzima E3. La fosforilazione rappresenta una modificazione particolarmente comune nel determinare il riconoscimento del substrato. Meno comune, tuttavia di grande importanza, è invece la defosforilazione. Le E3 ubiquitina ligasi svolgono quindi l'importante funzione di legare l'enzima E2, selezionare specifiche proteine e catalizzare la reazione di trasferimento dell'ubiquitina al substrato proteico. Il numero delle E3 ubiquitina ligasi identificate fino a oggi si approssima al migliaio.

Le E3 ubiquitina ligasi

Gli enzimi E3 meglio caratterizzati appartengono a due famiglie (Ravid & Hochstrasser, 2008): le RING (Really Interesting New Gene) finger ubiquitina ligasi e le HECT (Homologous to E6AP Carboxy Terminus) ubiquitina ligasi. La principale differenza tra le due famiglie di E3 ubiquitina ligasi è data dalla capacità delle HECT ligasi di catalizzare il trasferimento dell'ubiquitina attivata dall'enzima E2 alla proteina target, capacità che invece non hanno le RING finger ligasi, le quali indirizzano gli enzimi E2 su dei specifici target (**Fig. 7**). Sostanzialmente le HECT ubiquitina ligasi

funzionano da sole come trasportatori dell'ubiquitina. Altri domini specifici strutturalmente correlati al dominio RING finger sono stati recentemente identificati: un altro dominio legante lo zinco chiamato PHD finger (Coscoy & Ganem, 2003), e un dominio U-box (Ohi et al., 2003).

Le E3 ubiquitina ligasi RING finger

Le E3 ubiquitina ligasi di questo tipo rappresentano la sottoclasse costituita dal maggior numero di proteine. Il RING finger è un motivo strutturale di approssimativamente 70 residui aminoacidici, responsabile delle interazioni proteina-proteina e proteina-nucleotidi; la maggior parte delle proteine che contengono questo dominio funzionale possiedono attività di E3 ubiquitina ligasi. Il motivo RING finger è caratterizzato da un residuo di cisteina e uno di istidina conservati e coordinati con due ioni zinco a formare una struttura compatta a ponte, con una caratteristica conformazione globulare, che interagisce con l'enzima (Rotin & Kumar, 2009). Gli ioni zinco e i loro ligandi sono cataliticamente inerti; inoltre, è la spaziatura tra gli ioni zinco a essere conservata nelle proteine RING finger, piuttosto che la sequenza primaria. Queste caratteristiche suggeriscono che questo motivo non sia direttamente implicato nella catalisi chimica, ma che piuttosto agisca come una struttura di sostegno molecolare che facilita l'avvicinamento e il legame dell'enzima E2 e il successivo trasferimento della molecola di ubiquitina al substrato (**Fig. 7**).

Questo gruppo di ubiquitina ligasi può essere suddiviso in due sottogruppi (Rotin & Kumar, 2009) (**Fig. 7**): le E3 ubiquitina ligasi RING finger a singola subunità e quelle multimeriche. Le prime utilizzano il dominio RING finger per interagire con l'enzima E2; all'interno dello stesso polipeptide è contenuto un dominio recettoriale che ha la funzione di reclutare il substrato. Nelle E3 ubiquitina ligasi RING finger multimeriche invece, la proteina contenente il motivo RING finger rappresenta una subunità di un complesso multiproteico; l'interazione di questa subunità con l'estremità C-terminale di una molecola di cullina assembla un complesso centrale che promuove la sintesi di catene di poli-ubiquitina. L'estremità N-terminale della cullina interagisce con una molecola adattatrice che recluta il substrato mediante il legame con un fattore di specificità.

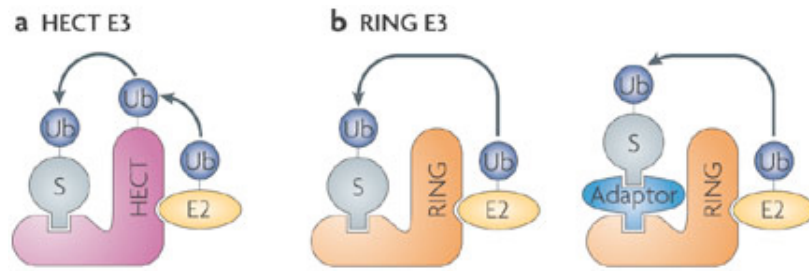


Figura 7. Le E3 ubiquitina ligasi. (a) Le HECT ligasi catalizzano il trasferimento dell'ubiquitina attivata dall'enzima E2 alla proteina target, formando un legame con l'ubiquitina. (b) Le RING finger ligasi indirizzano gli enzimi E2 su dei specifici target senza legare direttamente l'ubiquitina. Possono essere a singola subunità o multimeriche. (Modificato da Rotin & Kumar, 2009)

Le E3 ubiquitina ligasi HECT

Le E3 ubiquitina ligasi HECT si caratterizzano per la presenza all'estremità C-terminale di un dominio HECT di approssimativamente 350 aminoacidi. Questo dominio è stato inizialmente identificato nella proteina E6-AP, un enzima cellulare che viene reclutato dall'oncoproteina E6 del papilloma virus umano, ed è responsabile del legame con l'enzima E2 e dell'attività catalitica (Huibregtse et al., 1995) (**Fig. 7**). Le HECT ligasi sono presenti in tutti gli eucarioti, dal lievito all'uomo, e hanno dimensioni che vanno da 80 a più di 500 kDa.

Le HECT ligasi possono essere classificate in tre sottofamiglie (Scheffner & Staub, 2007):

1. HERC E3, che possiedono un dominio RDL (mitotic Regulator RCC1-Like domain);
2. C2-WW-HECT E3, che possiedono domini WW (domini Trp-Trp), conosciute anche come HECT ligasi Nedd4-like;
3. SI(ngle)-HECT E3s, le quali non hanno ne domini RDL ne domini WW.

Data l'identificazione di vari oncosoppressori come substrati delle HECT ligasi (Bernassola et al., 2008), come la scoperta di aberrazioni geniche in alcuni componenti della famiglia in tumori umani, appare logico supporre che le HECT ligasi possono avere un potenziale oncogenico, che è attualmente oggetto di numerosi studi.

La sottofamiglia C2-WW-HECT

La sottofamiglia C2-WW-HECT rappresenta il sottogruppo di HECT ligasi meglio caratterizzato, conservato evolutivamente dal lievito all'uomo. Nell'uomo e nel topo questo gruppo comprende nove membri. Queste proteine condividono una caratteristica struttura modulare che comprende all'N-terminale un dominio C2 correlato alla proteina chinasi C (PKC), da due a quattro domini WW e un dominio HECT all'estremità C-terminale (Schwarz et al., 1998).

Il dominio C2 prende il nome dalla sua capacità di legare Ca^{2+} ; è inoltre coinvolto nella localizzazione della proteina in corrispondenza delle membrane intracellulari, attraverso il legame con i fosfolipidi (Dunn et al., 2004).

I domini WW, presenti in una varietà di proteine cellulari, sono piccoli moduli composti approssimativamente da un totale di 35 aminoacidi. Vengono così chiamati per la presenza di due residui di triptofano separati da un tratto di 20-22 residui aminoacidici. Sono capaci di legare motivi ricchi in prolina (PRR) designati come PPxY, PPLP, PR e le fosfo-serine/treonine seguite da un residuo di prolina. Le E3 ligasi contenenti questi domini interagiscono preferenzialmente con il motivo PPpY.

Le ligasi di questa sottofamiglia sono coinvolte in diversi processi, tra cui endocitosi, degradazione delle proteine di membrana e controllo della crescita cellulare. (Scheffner & Staub, 2007). Sono regolate attraverso modificazioni posttraduzionali e/o interazione con proteine adattatrici (Kee & Huibregtse, 2007).

A questo gruppo di ubiquitina ligasi appartiene la proteina Itch, oggetto di studio in questo lavoro.

La E3 ubiquitina ligasi Itch

La E3 ubiquitina ligasi Itch (anche conosciuta come AIP4, Atrophin-1 Interacting Protein 4), è stata inizialmente identificata mediante studi genetici volti ad analizzare mutazioni del locus *agouti*, le cui mutazioni nel topo portano ad alterazioni nella colorazione del pelo (Perry et al., 1998). La mutazione 18H (*a^{18H}*), la quale è associata a un mantello scuro, è generata da un'inversione cromosomica indotta da radiazioni, che elimina 18 e 20 paia di basi dalla porzione prossimale e distale della rottura cromosomica, rispettivamente. L'inversione causa la perdita dell'espressione dei geni *agouti* e *Itch* (**Fig. 8**).

Il gene *Itch* codifica per una proteina di 854 aminoacidi con un peso molecolare di 113 kDa. Itch è una proteina monomerica, che appartiene alla sottofamiglia C2-WW-HECT delle HECT ligasi. Strutturalmente è organizzata in un dominio C2 all'estremità N-terminale che si lega ai fosfolipidi in modo Ca²⁺-dipendente, domini WW che mediano l'interazione proteina-proteina, e un dominio HECT all'estremità C-terminale (**Fig. 9**). Quest'ultimo si associa con l'enzima E2 e contiene una cisteina evolutivamente conservata, la quale forma legami tioestere con l'ubiquitina, prima dell'attacco dell'ubiquitina con le proteine target (Huibregtse et al., 1995).

Itch possiede quattro domini WW e un unico motivo PRR (regione ricca in prolina) localizzato tra i residui 195 e 246, il quale possiede importanti funzioni regolatorie. Come altre HECT ligasi, i domini WW di Itch riconoscono preferenzialmente la sequenza consenso PPxY, come anche le fosfo-serine/treonine seguite da un residuo di prolina. Inoltre, sono state descritte interazioni atipiche con domini modulari del substrato (Qiu et al., 2000; Marchese et al., 2003; Wegierski et al., 2006) o proteine adattatrici (Courbard et al., 2002; Oberst et al., 2007).

Sebbene una piccola frazione di Itch ha una localizzazione perinucleare (coincidendo con il network del trans-Golgi), la proteina è principalmente associata con compartimenti endosomici, precoci e tardivi, e lisosomi, attraverso il dominio C2 (Marchese et al., 2003; Angers et al., 2004).

Fenotipo immunologico del topo *Itchy*

Il topo non-*agouti*-lethal 18H o topo *Itchy* (*Itch^{-/-}*) presenta dei gravi difetti immunitari e infiammatori e manifesta un prurito persistente (Perry

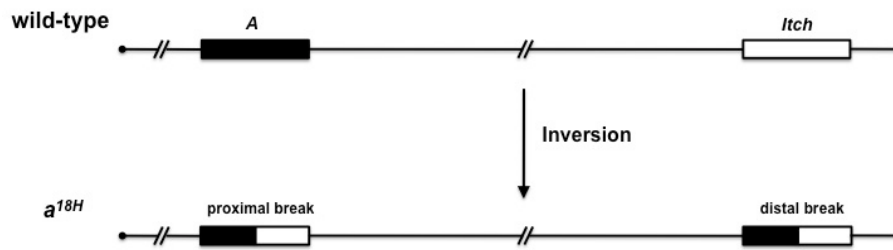


Figura 8. La mutazione 18H (*a^{18H}*) è generata da un'inversione cromosomica. L'inversione elimina 18 e 20 paia di basi dalla porzione prossimale e distale della rottura cromosomica, rispettivamente e causa la perdita dell'espressione dei geni *agouti* e *Itch*.

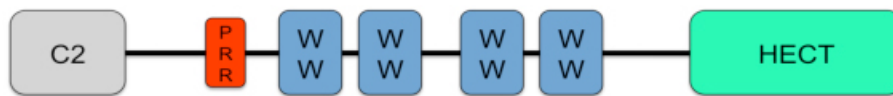


Figura 9. Struttura della proteina Itch. Itch possiede un dominio Ca^{2+} -dipendente C2 all'estremità N-terminale, quattro domini WW e un dominio HECT all'estremità C-terminale. Il motivo PRR possiede funzioni regolatorie.

et al., 1998). Nel background C57BL/6J la mancanza di Itch causa una malattia spontanea tipo autoimmune progressivamente letale, caratterizzata da linfoproliferazione nella milza, linfonodi e la regione midollare del timo, e da infiammazione cronica degli interstizi polmonari. La morte avviene all'età di 6-8 mesi a causa di ipossia, associata all'infiammazione polmonare e proteinasi alveolare.

Le cellule T-helper (T_H) $CD4^+$ possono differenziare in due tipi diversi di cellule effettrici, T_H1 e T_H2 , caratterizzate da differente produzione di citochine e da funzioni regolatorie distinte. Le cellule T_H2 producono tipicamente interleuchina-4 (IL-4) e agiscono contro i patogeni extracellulari. La deregolazione della risposta T_H2 -mediata causa lo sviluppo e mantenimento di malattie asmatiche e allergiche, come infiammazione allergica delle vie aeree e dermatite atopica. In risposta a stimolazione anti-CD3- e anti-CD4-mediata, i linfociti T $Itch^{-/-}$ mostrano un aumento nella produzione di citochine T_H2 (come IL-4 e IL-5), che causa il parziale differenziamento delle cellule $CD4^+$ in cellule T_H2 e attivazione cronica (Fang et al., 2008). Di conseguenza il topo *Itchy* mostra elevati livelli di immunoglobuline (Ig) T_H2 -dipendenti (come IgG1 e IgE).

La caratterizzazione del topo *Itchy* nel background JU/Ct o C57BL/10 ha permesso di capire che la produzione di citochine derivanti dalle cellule T_H2 non è l'unico fattore determinante lo sviluppo della malattia autoimmune (Parravicini et al., 2008). Infatti, è stato recentemente riportato che la mancanza di Itch in cellule T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ causa l'espansione dei linfociti B1b, portando all'aumento delle IgM, e la produzione di IgE, rispettivamente. L'espansione dei linfociti B1b e gli elevati livelli di Ig sono correlati con il prurito e altri sintomi infiammatori osservati nel topo *Itchy*. L'esistenza di diversi modelli animali in cui manca Itch contribuirà certamente a svelare i complessi difetti molecolari che portano alla patologia autoimmune che si osserva in questi topi.

I substrati di Itch

Itch regola la stabilità sia di recettori transmembrana, mediante mono-ubiquitilazione o multi-ubiquitilazione, che di substrati intracellulari, mediante poli-ubiquitilazione, portandoli a degradazione lisosoma- e proteasoma-dipendente rispettivamente. Inoltre, è stato visto che l'ubiquitilazione catalizzata da Itch può essere anche non proteolitica (Bai et al., 2004; Wegierski et al., 2006).

Sono stati identificati diversi substrati di Itch, molti dei quali sono importanti fattori che regolano la risposta immunitaria e la morte cellulare (**Fig. 10**).

Regolazione della risposta immunitaria

Molti substrati di Itch giocano un ruolo importante nella risposta immunitaria. Quelli che seguono si sono rivelati importanti nel spiegare l'abilità di Itch nel regolare il sistema immunitario e i difetti osservati nel topo *Itchy*.

Membri della famiglia Jun: L'identificazione di cJun e JunB come substrati di Itch (Fang et al., 2002) ha messo in luce le cause del fenotipo immunologico del topo *Itchy*. cJun e JunB contengono motivi PY o PXY che servono da siti di legame per i domini WW di Itch. La degradazione di JunB, mediata da Itch, induce una riduzione del legame del fattore di trascrizione al promotore di IL-4 dopo stimolazione delle cellule T (Fang et al., 2002). Dato che JunB si accumula nelle cellule T_H2 ed è coinvolto nel loro differenziamento, attraverso l'induzione di IL-4 e IL-5 (Li et al., 1999; Hartenstein et al., 2002), questa proteina rappresenta un buon candidato nel mediare la deregolazione della funzione delle cellule T $CD4^+$ osservata nel topo *Itchy*. In condizioni fisiologiche, Itch induce la degradazione di JunB mantenendo i livelli di IL-4 bassi, attenuando il differenziamento delle cellule T_H2 (**Fig. 11**). D'altra parte, l'espressione aberrante di JunB, risultante da mutazioni o downregolazione di Itch, portano le cellule T a differenziare in cellule T_H2 (**Fig. 11**), causando la loro iperproliferazione e una risposta allergica anomala, caratterizzata dall'elevata produzione di immunoglobuline IgG1 e IgE (Fang et al., 2002).

Recettori Notch: Il segnale di Notch è in grado di determinare il destino delle cellule durante il differenziamento e la morfogenesi tessuto-dipendente. Durante il differenziamento dei linfociti, le proteine Notch giocano un ruolo essenziale nell'induzione delle cellule T e B e nella determinazione del loro destino, incluso il differenziamento in cellule T_H2 (Osborne & Minter, 2007) (**Fig. 12**). Inoltre Notch promuove l'attivazione e la sopravvivenza dei linfociti T periferici maturi, mediante la upregolazione di proteine anti-apoptotiche, come Bcl-2 e gli inibitori delle proteine apoptotiche (IAP) e l'attivazione di AKT (Jenkinson et al., 2006) (**Fig. 12**).

Substrate	Function	Biological outcome	Regulators/ adaptors
c-Jun	Transcription factor	Regulation of T _H 2 cell differentiation/energy	JNK, N4BP1
Jun-B	Transcription factor	Regulation of T _H 2 cell differentiation/energy	JNK, Fyn, Ndfip1
PLC- γ 1	Phospholipase	Regulation of T-cell energy	Unknown
PKC- θ	Kinase	Regulation of T-cell energy	Unknown
Notch	Transcription factor	Regulation of autoimmunity	Numb
Gli	Transcription factor	Repression of Hedgehog signaling	Numb
Deltex	Regulator of Notch signals	Regulation of autoimmunity	Unknown
Smad2	Receptor-activated Smad	Activation of TGF β R signaling	Unknown
TIEG1	Transcription factor	Activation of TGF β R signaling	Unknown
P73	Transcription factor	Regulation of apoptosis, neural development, cancer	N4BP1
P63	Transcription factor	Regulation of apoptosis, epithelial development, cancer	N4BP1
c-Flip	Apoptosis inhibitory protein	Regulation of apoptosis	JNK
ErbB4	Growth factor receptor	Epithelial kinase receptor, cancer	Unknown
Endophilin A1	Protein of the endocytic machinery	Regulation of EGFR endocytosis	Unknown
CXCR4	Chemokine receptor	Agonist-dependent sorting of G protein-coupled receptors	Unknown
Hsr	Protein of the endocytic machinery	Regulation of cargo sorting	Unknown
TRPV4, TRPC4	Cation channels	Regulation of channel recycling and abundance at the cell surface	Unknown
Itch	E3 ubiquitin ligase	Control of protein stability, potential regulation of E3 catalytic activity	USP9X/FAM

Figura 10. Substrati di Itch. Molti substrati di Itch sono importanti fattori che regolano la risposta immunitaria, il pathway di TGF- β , il “signalling” dei recettori di membrana, la morte cellulare e il differenziamento epidermico dei cheratinociti. (Modificato da Melino et al., 2008)

Durante la cascata di segnale di trasduzione, le proteine Notch vengono tagliate proteoliticamente dopo il legame di un ligando extracellulare o l'attivazione dei linfociti CD4⁺, rilasciando l'ICD. La poli-ubiquitilazione dell'ICD di Notch1 mediata da Itch comporta la degradazione dell'ICD, e quindi l'inibizione dell'attività nucleare di Notch1 (Qiu et al., 2000; McGill et al., 2003) (**Fig. 12**).

Data la mancanza di motivi PY, Notch1 viene reclutato da Itch attraverso una regione presente all'N-terminale dell'ICD. L'affinità di Itch per Notch1, e la risultante degradazione del recettore, sono finemente regolati dall'azione di una proteina adattatrice chiamata Numb (McGill et al., 2003). La regolazione dei livelli di Notch1 è ottenuta inoltre attraverso la degradazione mediata da Itch di Deltex, il quale controlla positivamente il pathway di Notch1 (Chastagner et al., 2006). Notch1 è stato proposto come uno dei target di Itch più rilevanti nel spiegare il fenotipo autoimmune del topo *Itchy*. Studi realizzati *in vivo*, utilizzando una forma di Notch1 costitutivamente attiva, specificamente espressa nei timociti, mostrano che l'aumento del segnale di Notch1 risulta in una patologia tipo autoimmune, simile a quella osservata nel topo *Itchy* (Matesic et al., 2006). Inoltre, il topo *Itchy* che esprime questa forma attivata di Notch1, mostra un fenotipo più grave, caratterizzato da splenomegalia, epatomegalia e linfadenopatia e infiammazione cronica. Il segnale di Notch1 regola positivamente l'espressione di IL-4 nelle cellule T CD4⁺. È quindi probabile che il fenotipo iperproliferativo e infiammatorio osservato nel topo *Itchy*, sia peggiorato da ulteriore produzione di IL-4 dovuta all'aumentata espressione di Notch1 nel topo doppio mutante. L'aumento dell'attività di Notch1, inoltre, induce il segnale di AKT, permettendo la sopravvivenza delle cellule, spiegando così la gravità della malattia osservata in questo topo (Sade et al., 2004) (**Fig. 12**).

Regolazione della morte cellulare

Membri della famiglia p53: I membri della famiglia p53, p73 e p63, condividono funzioni simili al fattore di trascrizione p53, essendo capaci di mediare l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi in risposta a stress cellulare indotto da danno al DNA (Melino et al., 2002; Bergamaschi et al., 2003; Gressner et al., 2005). L'attività di soppressione tumorale di queste proteine è stata dimostrata con l'osservazione che il topo eterozigote per p73 sviluppa spontaneamente vari tumori (Flores et al., 2005).

Sia p63 sia p73 possiedono un motivo PY (mancante nella proteina p53) localizzato all'estremità C-terminale, il quale è necessario per il legame a

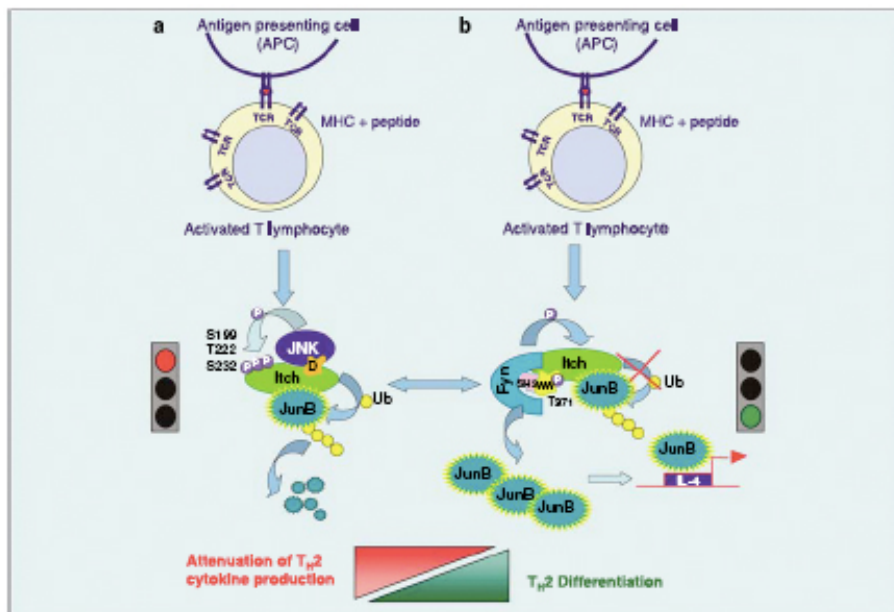


Figura 11. Regolazione di Itch dopo stimolazione del TCR. L'interazione del TCR con un peptide antigenico presente su una molecola MHC di classe II attiva la risposta di una cellula T CD4⁺. (a) L'attenuazione della risposta TH2 è mediata dal segnale della chinasi JNK che attiva Itch portando JunB a degradazione. (b) Il potenziamento della risposta TH2 è promossa dalla chinasi Fyn che inibisce la degradazione di JunB mediata da Itch. (Melino et al., 2008)

Itch attraverso il dominio WW2 (Rossi et al., 2005; Rossi et al., 2006). In condizioni normali i livelli proteici di p63 e p73 sono generalmente mantenuti bassi mediante l'ubiquitilazione mediata da Itch. In risposta a stress genotossici, l'induzione e attivazione trascrizionale di p63 e p73 viene principalmente controllata a livello post-traduzionale e, almeno parzialmente, promossa dalla down regolazione di Itch causata dal danno al DNA (Rossi et al., 2005; Hansen et al., 2007), il cui meccanismo molecolare è ancora da chiarire.

L'upregolazione E2F1-dipendente del messaggero di p73 è un segnale determinante nel pathway apoptotico delle cellule T iniziato dal segnale del recettore delle cellule T (TCR) (Lissy et al., 2000; Irwin et al., 2000). Quindi, un altro interessante scenario in cui Itch gioca un ruolo importante nel regolare la stabilità di p73 è la morte cellulare indotta da attivazione (AICD) dei linfociti T. Dato che Itch può essere regolato negativamente in risposta alla stimolazione del TCR (descritto successivamente nel testo), è plausibile che la stimolazione del recettore possa aumentare i livelli di p73 e le sue funzioni pro-apoptotiche (**Fig. 13**).

c-FLIP_L: La citochina proinfiammatoria TNF α (tumour necrosis factor alpha) funge da segnale sia per la sopravvivenza della cellula (attraverso l'attivazione IKK-dipendente del fattore di trascrizione NF- κ B) che per l'apoptosi (mediante la formazione di un complesso che contiene la proteina adattatrice FADD e la pro-caspasi-8). NF- κ B previene l'attivazione della caspasi-8 mediante l'induzione della proteina c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein), una proteina adattatrice che inibisce specificamente la caspasi-8. Quindi, NF- κ B può regolare negativamente l'apoptosi indotta al TNF α attraverso la regolazione dei livelli di c-FLIP (Lin & Karin, 2003). Al contrario, l'attività della chinasi JNK1 (Jun N-terminal Kinase1) controlla la morte mediata dal TNF α attraverso la degradazione proteasoma-dipendente di c-FLIP_L (l'isoforma più lunga di c-FLIP) attivando Itch (Chang et al., 2006). La specificità per c-FLIP_L è dettata dal fatto che Itch possiede un dominio criptico capace di interagire con il dominio CASP (C-terminal caspase-8-like) presente solo nell'isoforma lunga di c-FLIP.

Regolazione dell'attività catalitica di Itch

L'attività catalitica e la capacità di riconoscere il substrato di Itch vengono regolate in vari modi, incluso attraverso modificazioni post-traduzionali e l'interazione con proteine adattatrici.

Fosforilazione: La fosforilazione delle proteine substrato, la quale facilita il riconoscimento da parte delle E3 ligasi, rappresenta un pathway regolatorio comune del processo di ubiquitilazione. A differenza delle RING finger ligasi, le HECT ligasi riconoscono il substrato indipendentemente dal loro stato di fosforilazione. La fosforilazione degli enzimi E3 gioca un ruolo importante nel modulare la loro attività catalitica e il riconoscimento del substrato. Studi biochimici e genetici hanno dimostrato che la chinasi JNK1 regola l'attività catalitica di Itch durante l'induzione delle cellule T (Gao et al., 2004). I siti fosforilati dalla JNK1 sono localizzati nella regione PRR di Itch, dove sono presenti tre residui di serina/treonina (Gallagher et al., 2006). Nello stato non fosforilato, l'attività di Itch viene regolata negativamente dall'interazione intramolecolare tra il dominio HECT e la regione centrale della proteina che comprende i motivi WW e PRR. In risposta all'attivazione delle cellule T, la JNK interagisce con un dominio presente nella regione prossimale del dominio HECT di Itch, fosforilando la ligasi su i residui Ser199, Thr222 e Ser232. La fosforilazione induce un cambiamento nella conformazione di Itch che destabilizza l'interazione tra il dominio HECT e i motivi WW/PRR, permettendo il riconoscimento del substrato e aumentando fortemente la sua attività catalitica (Gallagher et al., 2006) (**Fig. 14**). L'attivazione del segnale della JNK1 porta alla degradazione mediata da Itch delle proteine della famiglia Jun, attenuando in questo modo il differenziamento dei linfociti T CD4⁺ in cellule T_H2 (**Fig. 11**). Attraverso l'attivazione fosforilazione-dipendente di Itch, JNK1 può indurre anche l'ubiquitilazione della proteina c-FLIP_L (Chang et al., 2006).

La fosforilazione può regolare l'attività catalitica di Itch anche negativamente. Questo tipo di regolazione è mediato dalla chinasi Scr, Fyn, la quale fosforila Itch sul residuo Tyr371 (Yang et al., 2006). Questa fosforilazione avviene nei linfociti T in risposta a stimolazione del TCR (**Fig. 13**). Il legame di Fyn a Itch è mediato dall'interazione del dominio SH3 di Fyn con il dominio WW3 della ligasi, dove è localizzato il residuo Tyr371. La fosforilazione di questo residuo impedisce il legame di Itch ai suoi substrati, come per esempio JunB. Quindi, dopo stimolazione del TCR, l'ubiquitilazione mediata da Itch di JunB viene ridotta e il fattore di

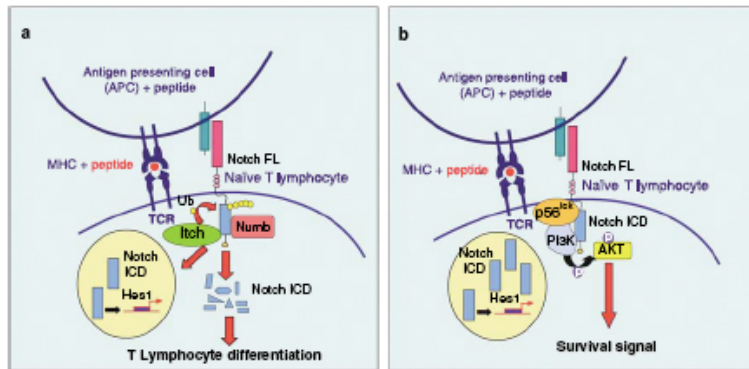


Figura 12. Regolazione Notch-dipendente dello sviluppo linfocitario: ruolo di Itch. Il legame di un ligando al recettore Notch porta al rilascio dell'ICD che dalla membrana trasloca nel nucleo. (a) Itch ubiquitila l'ICD col contributo di Numb, portandolo a degradazione, regolando il differenziamento delle cellule T. (b) Notch promuove l'attivazione e la sopravvivenza dei linfociti T periferici maturi inducendo l'espressione di proteine anti-apoptotiche, incluso AKT. (Melino et al., 2008)

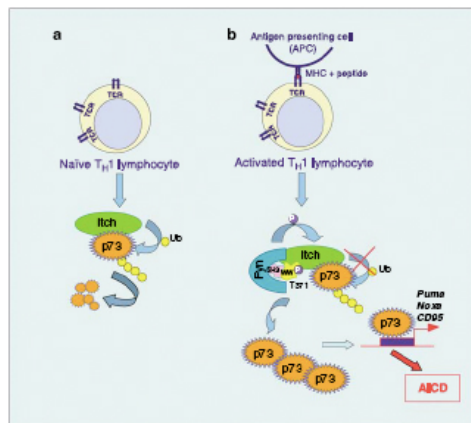


Figura 13. Itch regola la morte cellulare indotta da attivazione (AICD). (a) Nei linfociti T_H1 naïve i livelli di p73 sono mantenuti bassi mediante l'attività di Itch. (b) Nei linfociti T_H1 attivati l'upregolazione di p73 può essere ottenuta mediante (i) down regolazione di Itch, (ii) fosforilazione di Itch da parte di Fyn, (iii) competizione inibitoria da parte di N4BP1 nei confronti di Itch. L'accumulo di p73 porta alla trans-attivazione di geni pro-apoptotici. (Melino et al., 2008)

trascrizione stabilizzato. A causa dell'aumentata degradazione di JunB, i linfociti T Fyn knockout mostrano una diminuita produzione di citochine T_H2. Un ulteriore tipo di regolazione dell'attivazione di Fyn in risposta alla stimolazione del TCR, può essere ottenuta mediante la stabilizzazione di p73. Infatti, in cellule T_H1 attivate, il controllo negativo esercitato su Itch da parte di Fyn può risultare in un aumento della stabilità di p73 e nell'induzione di AICD (**Fig. 13**).

Ubiquitilazione contro deubiquitilazione: In vivo Itch può andare in contro ad auto-ubiquitilazione (Gao et al., 2004; Gallagher et al., 2006; Mouchantaf et al., 2006). È stato recentemente proposto che, similmente alle altre E3 ligasi, l'attività autocatalitica di Itch controlla negativamente la propria stabilità (Mouchantaf et al., 2006).Ciò nonostante, l'auto-ubiquitilazione di Itch può avere anche una funzione regolatoria non proteolitica, modulando la sua localizzazione cellulare o l'attività catalitica (Gao et al., 2004; Gallagher et al., 2006). L'auto-ubiquitilazione di Itch è controllata in vari modi, essendo stimolata dall'attivazione della JNK1 e inibita dall'associazione con la proteina interattrice N4BP1 (Nedd4-binding partner-1) (Oberst et al., 2007). Inoltre, Itch è un substrato dell'attività deubiquitilante di FAM/USP9X, un membro delle proteasi ubiquitina-specifiche (USP) (Mouchantaf et al., 2006). FAM/USP9X impedisce l'auto-ubiquitilazione di Itch, proteggendo la ligasi dalla degradazione proteasomica. È anche possibile che FAM/USP9X serva per generare specie mono-ubiquitilate, aggiungendo un altro tipo di controllo nella regolazione della ligasi.

Interazione con proteine adattatrici: L'attività catalitica di Itch può essere regolata anche dall'interazione con proteine adattatrici, le quali modulano la sua capacità di riconoscere il substrato, la localizzazione subcellulare e l'attività enzimatica (Shearwin-Whyatt et al., 2006).

N4BP1 è un regolatore negativo di Itch che agisce come competitore per il riconoscimento del substrato. Sebbene N4BP1 non contiene una sequenza canonica riconosciuta dal dominio WW, è capace di legare questo dominio determinando l'allontanamento dei substrati dalla ligasi, prevenendo la loro ubiquitilazione e prolungandone l'emivita (Oberst et al., 2007). Infatti, N4BP1 potenzia l'attività trascrizionale sia di p73 sia di cJun. Il meccanismo di competizione implica che la selettività di Itch per il substrato può essere modulata da cambiamenti nell'affinità di legame alla proteina adattatrice, o da alterazione della sua disponibilità all'interno della cellula. In questo

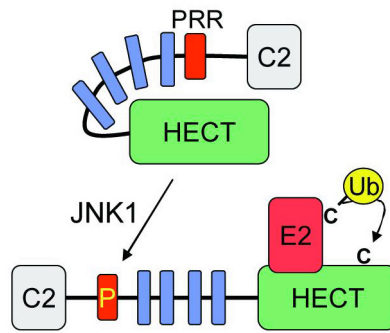


Figura 14. Attivazione fosforilazione-dipendente di Itch. Itch adotta una conformazione chiusa inattiva dovuta a interazioni intramolecolari tra la regione WW-PRR e il dominio HECT. In risposta a segnali cellulari la chinasi JNK1 viene reclutata, e fosforila siti multipli nella regione PRR (regione ricca in prolina). Questo porta all'eliminazione di interazioni inibitorie, portando all'attivazione dell'enzima (Modificato da Kee & Huibregtse, 2007)

contesto, l'accumulo di cJun e p73, indotto dalla stimolazione del TCR, può essere ottenuto mediante l'induzione di N4BP1, o attraverso modificazioni conformazionali che aumentano l'affinità di N4BP1 alla ligasi.

Ndfip1 (Nedd4 family interacting protein-1) è una proteina associata alla membrana che possiede due motivi PY all'N-terminale, i quali mediano il legame con la ligasi Nedd4 come anche Itch (Harvey et al., 2002). Nei mammiferi questa interazione promuove la degradazione mediata da Itch di substrati target che possono legare Ndfip1 ma non direttamente Itch (Oliver et al., 2006). Questa interazione è particolarmente rilevante dopo stimolazione delle cellule T, dove, come risultato dell'induzione di Ndfip1, Itch si sposta dalle vescicole intracellulari alla parte interna della membrana plasmatica. Di conseguenza l'aumentata degradazione di JunB previene la produzione di citochine da parte delle cellule T_H2. Questa interazione funzionale è dimostrata dal fenotipo manifestato dai topi knockout per Ndfip1. Infatti, similmente ai topi *Itchy*, questi animali sono soggetti allo sviluppo di gravi infiammazioni polmonari e della cute, accompagnati da epatomegalia e splenomegalia, e un alto numero di eosinofili infiltranti nei siti di infiammazione. La mancanza di Ndfip1 predispone i linfociti T verso un fenotipo T_H2. Un altro interattore di Itch è l'omologo umano di *Drosophila* Numb (McGill & Mc Glade, 2003). Numb possiede un dominio legante fosfotirosina (PTB, phosphotyrosine-binding) che recluta il dominio intracellulare di Notch1, cooperando nell'ubiquitilazione mediata da Itch del recettore di membrana, e promuovendo in maniera specifica la degradazione del dominio intracellulare della proteina (ICD), (McGill & Mc Glade, 2003) (**Fig. 12**). Questo effetto è ottenuto attraverso il legame diretto di Numb ai domini WW1/2 di Itch. Promuovendo la rapida degradazione dell'ICD Numb previene la traslocazione del recettore attivato nel nucleo, inibendo quindi il segnale di trasduzione di Notch1.

Anche l'ubiquitilazione e degradazione mediata da Itch del fattore di trascrizione Gli è regolata da Numb. Gli media il "signaling" di Hedgehog nel mantenimento e rinnovo delle cellule staminali neuronali. Numb stabilizza il complesso ligasi/substrato, e coopera con la ligasi nel riconoscimento di Gli come substrato. Numb agisce quindi come un regolatore antagonista del "signaling" di Hedgehog durante lo sviluppo cerebellare (Di Marcotullio et al., 2006).

SCOPO DEL LAVORO

Itch è una E3 ubiquitina ligasi mancante nei topi non-agouti-lethal 18H, anche conosciuti come *Itchy* mice, i quali sviluppano una grave malattia immunitaria. Vari studi hanno dimostrato che Itch regola la degradazione di proteine coinvolte nella risposta immunitaria e nella morte cellulare, permettendo di risalire al ruolo di Itch nello sviluppo di tale difetto immunitario.

Alcuni substrati di Itch sono inoltre fattori di trascrizione con un ruolo specifico nello sviluppo epidermico, come p63, cJun, JunB e Notch1, lasciando quindi ipotizzare un ruolo di Itch nello sviluppo della cute. Lo scopo di questo lavoro è la caratterizzazione del fenotipo epidermico dei topi *Itch*^{-/-}, sia in condizioni normali sia durante il processo di riparo della ferita.

RISULTATI

Analisi morfologica dell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-}

L'analisi morfologica dell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-} è stata effettuata su biopsie di cute prelevate dal dorso di topi appena nati (New Born, NB). Sebbene a questa età la cute si presenti senza peli, l'epidermide è completamente formata, e quindi rappresenta un ottimo modello di studio. Nella **Fig. 1a** vengono mostrate delle colorazioni con ematossilina/eosina di questi campioni. La cute dei topi *Itch*^{-/-} appare strutturalmente normale, presentando tutti gli strati epidermici. L'epidermide di questi animali risulta però più spessa rispetto a quella dei topi wild-type (WT), in particolare lo strato spinoso sembra essere formato da un numero maggiore di strati. Allo stesso modo è stata analizzata la morfologia dell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-} adulti (2 mesi di età). Come si osserva in **Fig. 1b**, a questa età non ci sono differenze tra i topi *Itch*^{-/-} e i WT.

L'aumento dello spessore epidermico osservato nei topi *Itch*^{-/-} NB è stato quantificato, misurando la distanza tra lo strato basale e lo strato granuloso. Nel grafico mostrato in **Fig. 1c** viene riportato lo spessore medio dell'epidermide nei due genotipi. Si può osservare che la cute dei topi *Itch*^{-/-} NB risulta significativamente più spessa rispetto a quella dei topi WT.

Proliferazione dei cheratinociti *Itch*^{-/-}

Lo sviluppo dell'epidermide è regolato da un equilibrio omeostatico tra la rigenerazione di nuovi cheratinociti da parte delle cellule staminali epidermiche e il loro differenziamento (Fuchs, 2007). Per capire se l'aumentato spessore dell'epidermide osservato nei topi *Itch*^{-/-} fosse dovuto a una maggiore proliferazione dei cheratinociti rispetto ai topi WT, sono stati analizzati i livelli di proliferazione dei cheratinociti epidermici, quantificando l'incorporazione della bromo-deossiuridina (BrdU) in esperimenti di immunofluorescenza (**Fig. 2a**). La BrdU si incorpora nel DNA durante la sua replicazione (fase S del ciclo cellulare), sostituendo il suo analogo, la timidina. Le cellule che la incorporano sono quindi proliferanti. Come si può osservare nel grafico in **Fig. 2b**, nell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-} c'è un maggior numero di cheratinociti che incorporano BrdU rispetto a quelli dell'epidermide di controllo. Inoltre, è stata analizzata l'espressione del marcatore di proliferazione Ki67 in esperimenti di immunofluorescenza (**Fig. 2c**). A supporto di una maggiore proliferazione

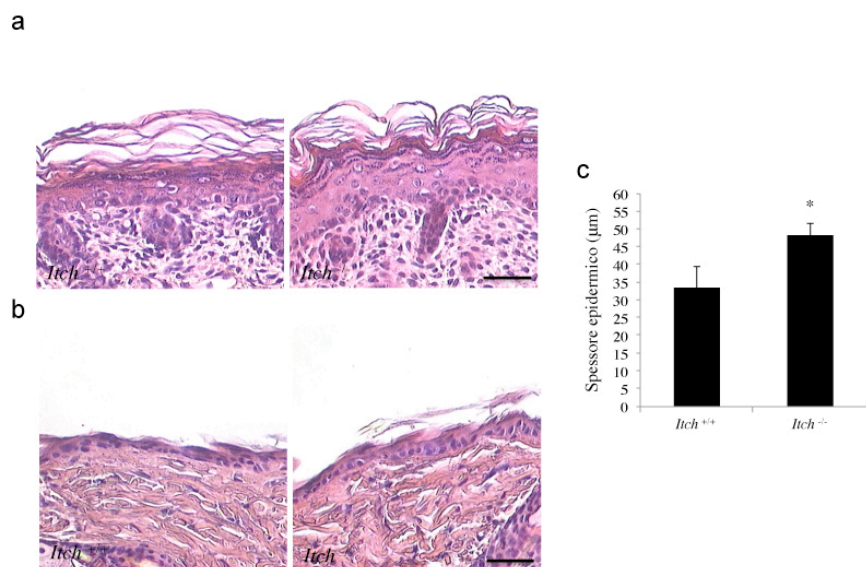


Figura 1. Analisi morfologica dell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-}. Colorazione con ematossilina/eosina di campioni di cute provenienti dal dorso di topi NB **(a)** e adulti (2 mm) **(b)**. Quantificazione dello spessore epidermico. Il grafico rappresenta la media \pm d.s. di tre topi analizzati in un esperimento rappresentativo (* $P < 0.05$). Le barre rappresentano 40 μ m.

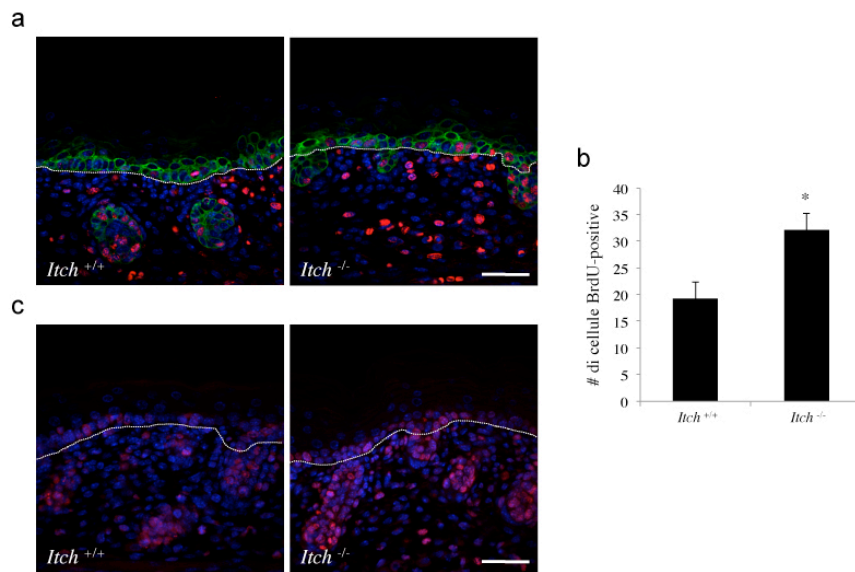


Figura 2. Analisi della proliferazione dei cheratinociti *Itch*^{-/-}. (a) Marcatura della BrdU (rosso) su sezioni di cute di topi E18.5. La K14 è mostrata in verde. I nuclei sono stati marcati utilizzando il colorante DAPI (blu). (b) Quantificazione delle cellule BrdU-positive nell'epidermide. Le cellule BrdU positive dell'epidermide sono state contate lungo una distanza lineare di 0,6 mm. Il grafico rappresenta la media \pm d.s. di tre topi analizzati in un esperimento rappresentativo (* $P < 0.05$). (c) Marcatura della Ki67 (rosso) su sezioni di cute di topi NB. I nuclei sono stati marcati utilizzando il colorante DAPI (blu). Le barre rappresentano 40 μ m.

nell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-}, le cellule Ki67-positive aumentano nell'epidermide di questi topi rispetto ai topi WT.

Espressione dei marcatori epidermici nei topi *Itch*^{-/-}

Per caratterizzare ulteriormente l'epidermide dei topi *Itch*^{-/-}, sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza, andando ad analizzare l'espressione di diversi marcatori della pelle nei topi NB. Le sezioni di cute sono state analizzate per l'espressione sia di marcatori dello strato basale proliferante (K14) che di marcatori degli strati differenzianti della pelle, come la K10 (marcatore precoce del differenziamento), l'involucrina e la loricrina (marcatori tardivi). Nella **Fig. 3a** si osserva che i topi *Itch*^{-/-} presentano un'espressione sensibilmente maggiore del marcatore dello strato basale, K14, rispetto ai topi di controllo. In particolare si può osservare uno strato di cellule proliferanti in più nel topo *Itch*^{-/-}. Anche l'espressione della K10 risulta essere aumentata in questi topi, che infatti mostrano un maggiore spessore dello strato spinoso, mentre l'espressione dei marcatori tardivi del differenziamento, involucrina e loricrina, non sembra essere modificata.

Lo stesso tipo di analisi è stato effettuato per valutare l'espressione dei marcatori epidermici in topi *Itch*^{-/-} adulti. Come mostrato in **Fig. 3b**, l'espressione di tutti i marcatori analizzati, sia quelli espressi nello strato proliferante che in quello differenziativo, non sembra essere alterata nei topi adulti *Itch*^{-/-}.

Differenziamento dei cheratinociti *Itch*^{-/-}

I dati fin ora ottenuti indicano che i topi *Itch*^{-/-} mostrano un'alterazione nel differenziamento epidermico. Per caratterizzare questa alterazione, è stato analizzato il differenziamento dei cheratinociti messi in coltura. In questo esperimento i cheratinociti sono stati prelevati da topi NB e indotti a differenziare *ex vivo*, mediante l'aggiunta di CaCl₂. Inizialmente è stata analizzata l'espressione di vari marcatori epidermici attraverso esperimenti di PCR real-time (**Fig. 4**). In **Fig. 4a** si osserva che l'espressione del messaggero per la K5, marcatore espresso negli strati basali proliferanti dell'epidermide, diminuisce più lentamente durante il differenziamento nei cheratinociti *Itch*^{-/-} rispetto a quelli WT. I livelli di *K10*, marcatore precoce

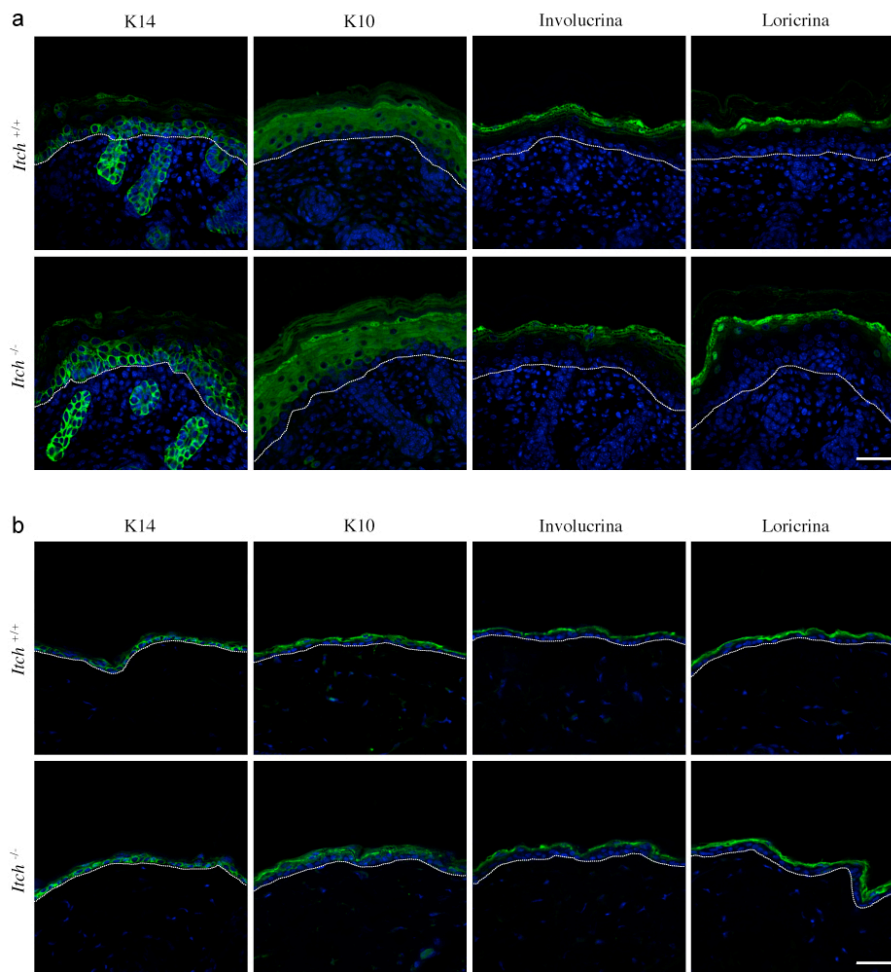


Figura 3. Espressione dei marcatori epidermici nei topi *Itch*^{-/-}. Immunofluorescenze di sezioni di cute di topi NB (a) e adulti (b). Le sezioni sono state colorate (verde) con anticorpi contro marcatori degli strati basali (K5) e differenziativi (K10, involucrina, loricrina) dell'epidermide. I nuclei sono stati marcati utilizzando il colorante DAPI (blu). Le barre rappresentano 40 μ m.

del differenziamento, aumentano invece in modo decisamente più rapido in questi cheratinociti (**Fig. 4b**). D'altra parte, i livelli dei messaggeri per la TG5 (**Fig. 4c**) e per l'involucrina (**Fig. 4d**), marcatori del differenziamento tardivo, aumentano più lentamente durante il differenziamento dei cheratinociti *Itch*^{-/-}, come se il processo fosse rallentato dalla mancanza di *Itch*. Per confermare queste osservazioni anche a livello proteico, estratti di cheratinociti murini indotti a differenziare *ex vivo* sono stati analizzati per Western blot. La **Fig. 4e** mostra che anche a livello proteico l'espressione dei marcatori epidermici viene alterato durante il differenziamento nei topi *Itch*^{-/-} rispetto a quelli WT. In particolare si osserva che durante il differenziamento la K5 diminuisce più lentamente, la K10 aumenta più velocemente e l'involucrina aumenta più lentamente.

Espressione dei substrati di *Itch* nei topi *Itch*^{-/-}

Itch è una E3 ubiquitina ligasi che controlla la degradazione di vari substrati coinvolti in numerosi processi cellulari. Tra questi ci sono vari fattori di trascrizione che hanno un ruolo importante nello sviluppo dell'epidermide, come p63, cJun, JunB e Notch1 (Melino et al., 2008). Dato che l'espressione di alcuni marcatori epidermici, controllata da questi fattori di trascrizione, risulta alterata nei topi *Itch*^{-/-}, i livelli di espressione di questi fattori trascrizionali sono stati analizzati nell'epidermide di questi topi. L'espressione dei substrati di *Itch* è stata inizialmente analizzata attraverso esperimenti di immunofluorescenza, in topi NB **Fig. 5a**. L'espressione di queste proteine è stata quantificata misurando il numero di cellule positive (per p63, cJun e JunB) o l'intensità media della colorazione (per Notch1). Il grafico in **Fig. 5b** rappresenta l'espressione relativa dei substrati di *Itch* nell'epidermide. L'espressione di tutte le proteine analizzate è significativamente aumentata nell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-}.

L'espressione di p63, cJun e JunB è stata inoltre valutata in cheratinociti primari indotti a differenziare, tramite Western blot. Come si può vedere in **Fig. 5c**, in tutti e tre i casi, l'espressione diminuisce durante il differenziamento fino a scomparire. Nei topi *Itch*^{-/-} questa diminuzione viene però rallentata.

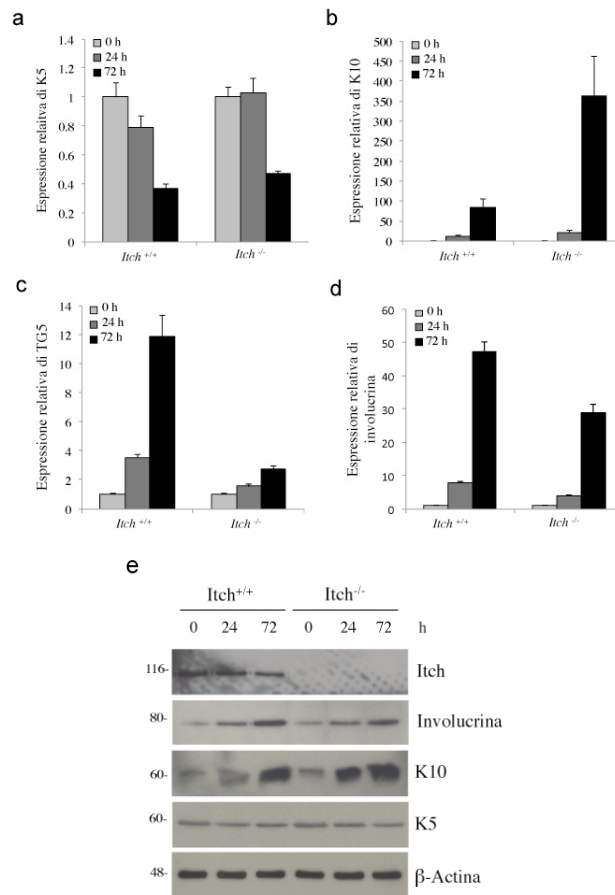


Figura 4. Espressione dei marcatori epidermici in cheratinociti *Itch*^{-/-} in differenziamento. Livelli di espressione dei messaggeri codificanti per K5 (a), K10 (b), TG5 (c) e involucrina (d) analizzati tramite PCR real-time. I grafici rappresentano la media \pm d.s. di tre esperimenti indipendenti. (e) Livelli di espressione dei marcatori epidermici analizzati tramite Western blot. I livelli d'espressione della β -Actina sono stati utilizzati come controllo del caricamento.

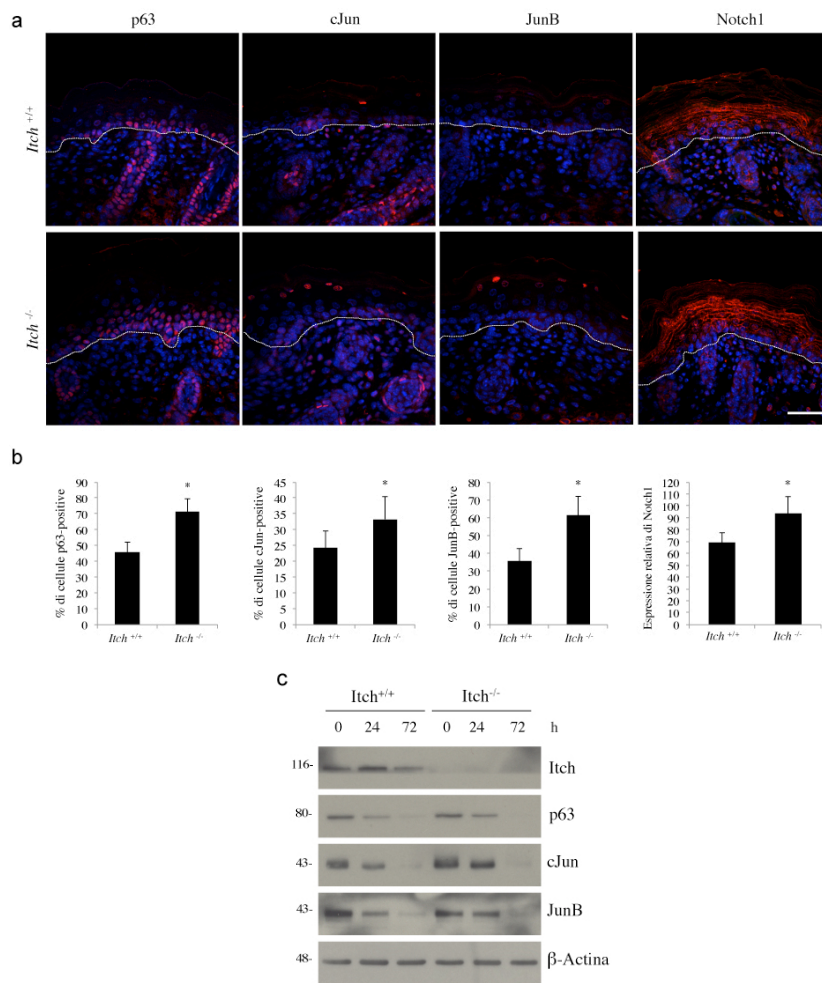


Figura 5. Espressione dei substrati di Itch in topi *Itch*^{-/-}. (a) Immunofluorescenze di sezioni di cute di topi NB. Le sezioni sono state marcate (rosso) con anticorpi contro i substrati di Itch. I nuclei sono stati marcati utilizzando il colorante DAPI (blu). (b) Quantificazione dell'espressione dei substrati di Itch nell'epidermide. Per p63, cJun e JunB le cellule positive sono state contate rispetto ai nuclei totali. Per Notch1 è stata valutata l'intensità media della colorazione. I grafici rappresentano la media \pm d.s. di tre topi analizzati in un esperimento rappresentativo (* $P < 0.05$). (c) Livelli di espressione dei substrati di Itch in cheratinociti murini differenziati, analizzati tramite Western blot. I livelli d'espressione della β -Actina sono stati utilizzati come controllo del caricamento. La barra rappresenta 40 μ m.

Formazione della barriera epidermica nei topi *Itch*^{-/-}

Molti modelli murini in cui viene alterata l'espressione dei marcatori del differenziamento epidermico mostrano alterazione nella formazione della barriera epidermica (Matsuki et al., 1998; Koch et al., 2000). La formazione di una barriera epidermica funzionale avviene tra i giorni E16.5 e E17.5 e coincide con la formazione dello strato corneo (Hardman et al., 1998). Per esaminare se la formazione della barriera epidermica fosse alterata nei topi *Itch*^{-/-} è stato eseguito il saggio di penetrazione del colorante blu di toluidina. In questi esperimenti i topi analizzati a vari stadi embrionali appartengono alla stessa progenie, affinché siano analizzati allo stesso stadio dello sviluppo. Come mostra la **Fig. 6a**, la formazione della barriera epidermica avviene essenzialmente allo stesso modo negli embrioni *Itch*^{-/-} rispetto a quelli WT: al giorno E16.5 gli embrioni sono totalmente permeabili al colorante, al giorno E17.5 la barriera inizia a formarsi dal dorso verso il ventre dell'embrione, variando leggermente tra topo e topo, mentre al giorno E18.5 la barriera è completamente formata sia nei topi *Itch*^{-/-} sia in quelli WT.

Anche nel saggio di penetrazione del colorante Lucifer yellow non ci sono differenze tra i due genotipi. Infatti, come si può vedere nella **Fig. 6b** il colorante (in verde) rimane associato allo strato corneo, senza mai penetrare negli strati sottostanti, sia nei topi *Itch*^{-/-} sia in quelli WT.

Dopo la nascita, lo strato corneo crea una barriera per la diffusione di materiale dall'interno verso l'esterno (Chen et al., 1997). Allo scopo di analizzare se questo tipo di diffusione fosse alterata nei topi *Itch*^{-/-} è stato realizzato un saggio di diffusione utilizzando un reagente biotinilato, il quale è stato iniettato sottocute nei topi NB. La diffusione di questo reagente è stata analizzata tramite immunofluorescenza usando streptavidina (molecola legante la biotina) coniugata con un fluoroforo. In **Fig. 6c** si osserva che nei due genotipi analizzati non c'è diffusione del reagente nello strato corneo, dimostrando la formazione di una barriera epidermica normale anche nei topi *Itch*^{-/-}.

Esposizione ai raggi UVB dei topi *Itch*^{-/-}

I dati ottenuti dimostrano che il fenotipo epidermico osservato nei topi *Itch*^{-/-} non altera l'efficienza della barriera epidermica. Una delle funzioni più importanti della cute è quella di proteggere contro gli stress ambientali. Le

radiazioni UVB rappresentano uno degli stress di maggiore rilevanza ai quali la cute è esposta. Per analizzare come la cute dei topi *Itch*^{-/-} risponde ai raggi UVB, il dorso di topi NB è stato irradiato con una dose 100 mJ/cm² di raggi UVB. Dopo 24 ore i topi sono stati sacrificati e una biopsia del dorso è stata processata e utilizzata per fare un saggio TUNEL. Il saggio TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling) è un metodo utilizzato per analizzare la frammentazione del DNA, risultante da segnali apoptotici come i raggi UVB. Il saggio permette di rilevare la presenza di tagli nel DNA mediante l'azione della trasferasi di deossinucleotidi terminale, un enzima che catalizza l'aggiunta di dUTP che vengono in seguito marcati. In **Fig. 6d** si osserva che dopo irradiazione con raggi UVB appaiono cellule apoptotiche (in rosso) nell'epidermide di entrambi i topi. L'apoptosi nell'epidermide è stata quantificata misurando il numero di cellule TUNEL-positivo lungo una distanza lineare. Il grafico in **Fig. 6e** mostra che, in entrambi i genotipi, il numero di cellule TUNEL-positivo è pressoché lo stesso.

Ruolo di Itch nel riparo della ferita

Il riparo della ferita è un processo evolutivamente conservato in cui avviene la riformazione della barriera epidermica (Werner & Grose 2003). In questo processo sono coinvolti numerosi tipi cellulari quali cheratinociti, fibroblasti, cellule endoteliali, macrofagi e piastrine. La migrazione, infiltrazione, proliferazione e differenziamento di queste cellule porta alla formazione di un nuovo tessuto e la chiusura della ferita. Dato il fenotipo iperproliferante osservato nei topi *Itch*^{-/-}, è stato analizzato se *Itch* potesse avere un ruolo nel processo di chiusura della ferita. A questo scopo, ferite del diametro di 1 cm² sono state fatte sul dorso di topi di circa 8 settimane di età. L'area della ferita è stata misurata giornalmente fino alla completa chiusura. In **Fig. 7a** viene graficata l'area della ferita in funzione del tempo, nei due gruppi di topi. Nel grafico si può vedere che il processo viene accelerato nei topi *Itch*^{-/-}. Infatti, l'area della ferita è a ogni punto sempre più piccola nei topi *Itch*^{-/-} rispetto ai topi WT è quindi si chiude completamente prima (14 giorni nei topi *Itch*^{-/-} rispetto a 18 giorni nei topi WT).

Durante la fase di ri-epitelizzazione giocano un ruolo cruciale le cheratine K6 e K14, marcatori di proliferazione cellulare (Wojcik et al., 2000; Chan et al., 2002). Esperimenti di immunistochemica sono stati effettuati per

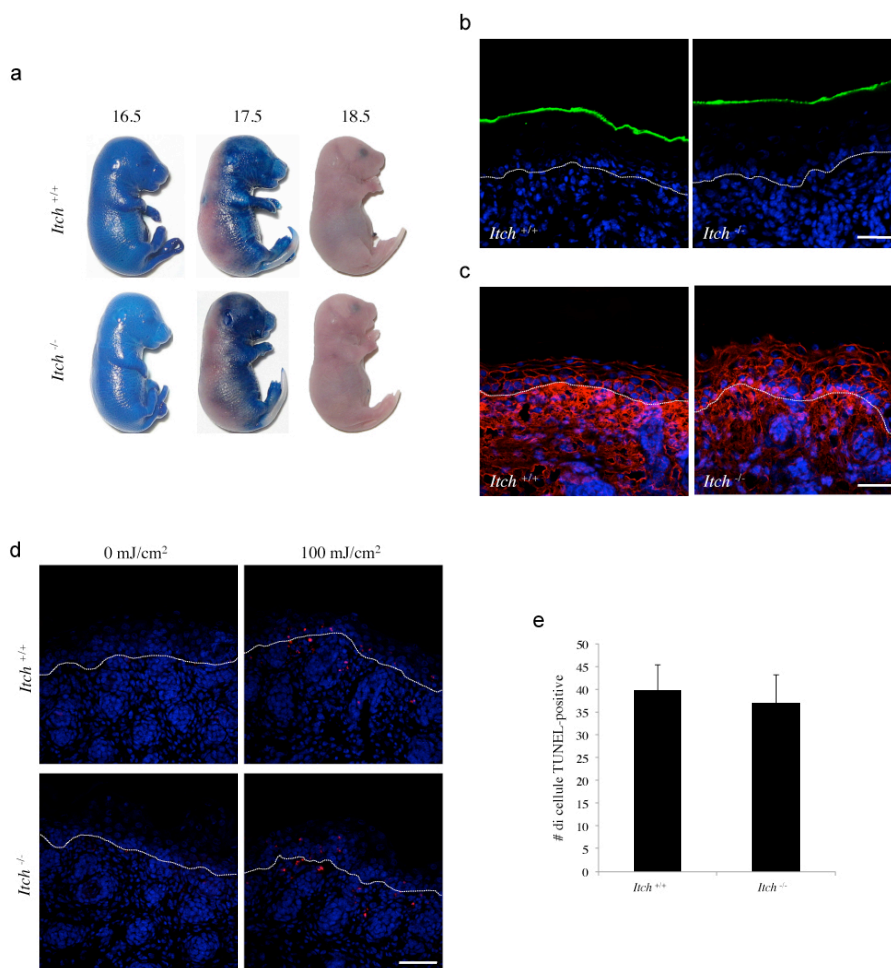


Figura 6. Formazione della barriera epidermica nei topi *Itch*^{-/-}. (a) Fotografie di embrioni murini colorati con blu di toluidina 0,1%. Gli embrioni sono stati isolati nei giorni indicati. (b) Immunofluorescenze di sezioni di cute di topi NB colorati con Lucifer yellow (verde). (c) Immunofluorescenze di sezioni di cute di topi NB iniettati sottocute con un reagente biotilante e in seguito marcati con streptavidina (rosso). (d) Immunofluorescenze di sezioni di cute di topi NB irradiati con raggi UVB e successivamente marcati mediante saggio TUNEL (rosso). (e) Quantificazione delle cellule TUNEL-positive nell'epidermide. Le cellule TUNEL-positive dell'epidermide sono state contate lungo una distanza lineare di 1 mm. Il grafico rappresenta la media \pm d.s. di tre topi analizzati in un esperimento rappresentativo (* $P < 0.05$). I nuclei in b, c e d sono stati marcati con il colorante DAPI (blu). Le barre rappresentano 40 μm in b e c e 60 μm in d.

valutare l'espressione di questi marcatori nell'area della ferita. La **Fig. 7b** mostra che sia la K6 sia la K14 vengono espresse in più strati di cellule nei topi *Itch^{-/-}* rispetto ai topi WT. Inoltre lo spessore del tessuto rigenerato è sensibilmente più grande nei topi *Itch^{-/-}*.

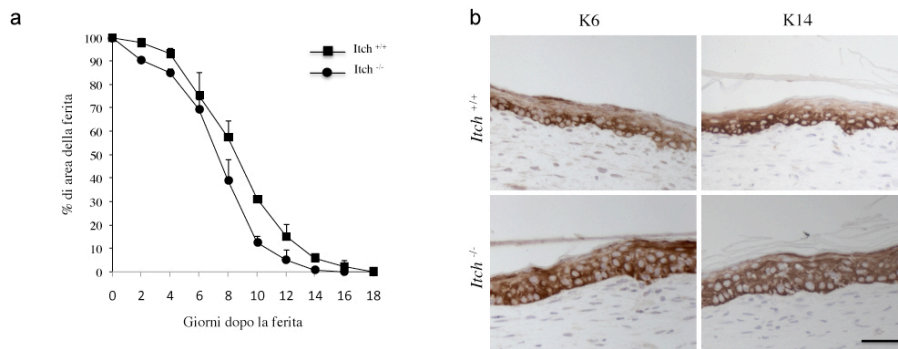


Figura 7. Riparo della ferita nei topi *Itch*^{-/-}. (a) Quantificazione della chiusura della ferita in topi adulti. Il grafico rappresenta la media \pm d.s. di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0.05$). (b) Immunoistochimica in sezioni di cute dell'area della ferita. Le sezioni sono state colorate con anticorpi contro marcatori di proliferazione, K6 e K14. La barra rappresenta 60 μ m.

DISCUSSIONE

Nel corso degli anni sono stati identificati diversi substrati di Itch, molti dei quali sono importanti fattori che regolano la risposta immunitaria e la morte cellulare. Questo si è rivelato importante per spiegare i difetti osservati nel topo *Itchy*. Gli animali utilizzati in questo studio, infatti, non esprimono la proteina Itch e sviluppano, dopo circa sei mesi di vita, gravi difetti immunitari e infiammatori, manifestando prurito persistente (Perry et al., 1998). Molti substrati di Itch sono inoltre fattori di trascrizione che controllano la proliferazione e il differenziamento dei cheratinociti, regolando la progressione spazio-temporale del differenziamento epidermico (Melino et al., 2008). È quindi logico pensare che la degradazione di questi fattori mediata da Itch abbia un ruolo nella biologia della cute. Il principale regolatore della proliferazione dei cheratinociti basali è la proteina p63. In accordo con l'attuale modello l'isoforma $\Delta Np63$ è responsabile del mantenimento del potenziale proliferativo dello strato epidermico basale, mentre l'isoforma TAp63 è coinvolta nelle prime fasi differenziali (Candi et al., 2006). La degradazione di p63 nell'epidermide blocca quindi la proliferazione dei cheratinociti basali che in questo modo vengono indirizzati a differenziare. I recettori Notch sono invece implicati nella regolazione della transizione tra cellule basali proliferanti e cellule soprabasali differenzianti, determinando il differenziamento dei progenitori basali in cellule dello strato spinoso. Infatti, Notch1 inibisce l'espressione dei geni tipicamente espressi negli strati basali, mentre attiva l'espressione di geni coinvolti nel differenziamento epidermico precoce (Blanpain et al., 2006). La degradazione di Notch1 nell'epidermide regola quindi il destino delle cellule spinose e il differenziamento dei cheratinociti. Nell'epidermide dei topi *Itch*^{-/-} l'espressione di p63 e Notch1 è alterata e questo può spiegare, almeno in parte, l'ispessimento epidermico osservato in questi animali. In condizioni normali Itch, degradando p63, diminuisce la capacità proliferativa dei cheratinociti dallo strato basale, permettendo a Notch1 di promuovere la transizione strato basale/spinoso (**Fig. 1a**). Nel topo *Itch*^{-/-}, la mancanza di Itch causa un accumulo dei suoi substrati, che risulta in una iperproliferazione epidermica, accompagnata da un aumento dell'espressione di marcatori dello strato basale come la K14, e di conseguenza un aumento del numero di cheratinociti indirizzati al differenziamento (**Fig. 1b**). L'aumento di proliferazione è dovuto molto probabilmente a un accumulo di p63 nelle cellule dello strato basale. Nei topi *Itch*^{-/-} oltre a una maggiore proliferazione basale, c'è un aumento dell'espressione di marcatori dello strato spinoso come la K10. L'aumento dello strato spinoso è probabilmente dovuto a un accumulo di Notch1. Infatti, il fenotipo epidermico mostrato da

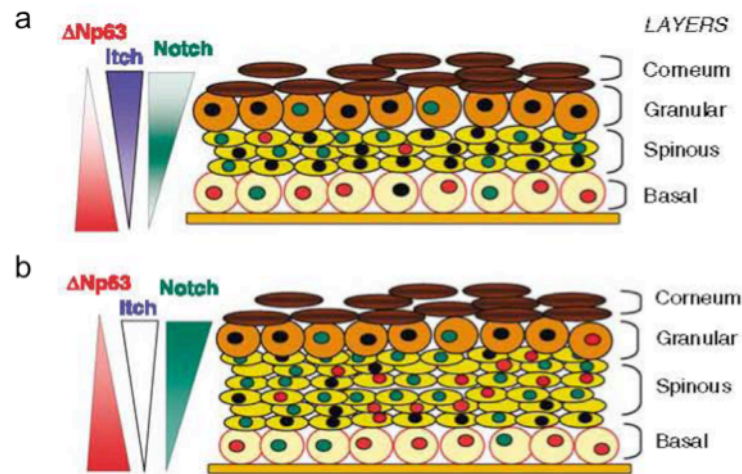


Figura 1. Possibile ruolo di Itch nello sviluppo epidermico. a) Itch, abbassando i livelli di p63, facilita lo spostamento dei cheratinociti dallo strato basale agli strati superiori, permettendo a Notch1 di promuovere la transizione strato basale/spinoso. **b)** La mancanza di Itch altera l'espressione dei suoi substrati, causando iperproliferazione epidermica e di conseguenza un aumentato numero di cheratinociti indirizzati al differenziamento.

topi in cui Notch1 è costitutivamente attivato nell'epidermide (situazione simile ai topi *Itch^{-/-}*) mostra una grande espansione dello strato spinoso (Blanpain et al., 2006). Quindi, l'aumento dello spessore cutaneo dei topi NB di *Itch^{-/-}* è dovuto ad almeno due fenomeni (**Fig. 1b**): (i) elevati livelli proteici di p63 e conseguente aumento della proliferazione dello strato basale; (ii) accumulo di Notch1 che causa un'espansione dello strato spinoso dell'epidermide.

I risultati ottenuti mostrano che nell'epidermide dei topi *Itch^{-/-}* viene alterata anche l'espressione dei fattori di trascrizione del complesso AP-1, cJun e JunB. È ben noto che il complesso AP-1 regola molti geni codificanti per proteine coinvolte nello sviluppo epidermico. Questi includono proteine espresse negli strati differenzianti precoci, ma anche negli strati differenzianti più tardivi (Zenz&Wagner 2006). Risulta quindi difficile speculare sulle conseguenze dell'aumentata espressione di queste proteine nell'epidermide in cui manca *Itch*. Molto probabilmente in questi topi la concomitante sovraespressione di p63, Notch1, cJun e JunB, fa sì che questi ultimi due agiscano più che altro regolando proteine espresse durante il differenziamento precoce, piuttosto che quelle espresse negli strati più differenziati, contribuendo all'espansione dei cheratinociti dello strato spinoso. Analizzando il differenziamento dei cheratinociti, infatti, si osserva che nei topi *Itch^{-/-}* questo processo viene rallentato.

L'epidermide ha la funzione di fornire agli organismi una barriera fisica essenziale alla loro sopravvivenza. Questa barriera è rappresentata dall'involucro corneo, il quale esclude sostanze e microorganismi esterni e impedisce la perdita di liquidi vitali in modo da garantire le proprietà specifiche della cute. L'importanza delle proteine che compongono l'involucro corneo appare chiara dall'analisi di modelli murini in cui la loro espressione è alterata. Infatti, questi topi presentano un'alterazione della barriera epidermica (Matsuki et al., 1998; Koch et al., 2000). Nella pelle dei topi *Itch^{-/-}*, nonostante l'espressione di alcuni marcatori epidermici sia alterata, la barriera epidermica è funzionale allo stesso modo che nei topi WT, come dimostrato da saggi di diffusione o da esposizione a stress ambientali come i raggi UVB.

Rimane da spiegare perché il fenotipo iperproliferativo osservato nei topi *Itch^{-/-}*, e quindi l'ispessimento epidermico, è presente solo nei topi appena nati. Infatti, l'epidermide dei topi *Itch^{-/-}* adulti è del tutto simile a quella dei topi WT, sia come spessore sia come espressione dei marcatori epidermici. Questo può dipendere dal fatto che i topi NB hanno una cute neo-formata che probabilmente non è ancora in grado di rimediare alla mancanza di *Itch*,

come invece avviene nell'epidermide dei topi adulti, oppure tale fenomeno risente dello sviluppo dei follicoli piliferi. Nell'adulto, infatti, il 90% della cute è occupata dai follicoli piliferi e solo il 10% rappresenta la cute interfollicolare. È possibile che Itch non abbia alcun ruolo nel controllare la proliferazione dei peli, quindi la sua mancanza nella cute di adulto è compensata da altri meccanismi che regolano la proliferazione e il ciclo pilifero. L'osservazione che la cute dei topi Itch^{-/-} adulti risulta essere molto simile al WT (sia in relazione alla proliferazione che allo spessore) suggerisce che, almeno per ciò che riguarda p63 e i meccanismi che controllano i suoi livelli proteici endogeni, ci sia una differenza del ruolo di Itch e miR-203. Recentemente, infatti, è stato dimostrato che miR-203 regola i livelli di p63 (Yi et al., 2008). Dai dati ottenuti è evidente che i livelli proteici di p63 durante lo sviluppo embrionale e nei NB sembrano essere regolati principalmente da Itch, mentre nell'adulto è possibile che i livelli di p63 siano regolati principalmente dal miR-203. Tale equilibrio sembra essere alterato in condizioni di stress quali il riparo della ferita.

Durante la rimarginazione delle ferite si ha una nuova epitelizzazione. In questo processo intervengono numerosi tipi cellulari che attraverso la proliferazione, la migrazione e il differenziamento portano alla formazione di un nuovo tessuto e alla chiusura della ferita (Werner & Grose, 2003). La mancanza di Itch rappresenta un vantaggio per quanto riguarda la chiusura della ferita. Infatti, le ferite dei topi Itch^{-/-} si chiudono prima rispetto a quelle dei topi WT. Inoltre nell'area della ferita nei topi Itch^{-/-} c'è una maggiore espressione dei marcatori di proliferazione K6 e K14. Tali risultati lasciano ipotizzare che Itch potrebbe avere un ruolo nella formazione di nuovo epitelio, come avviene nel riparo della ferita, piuttosto che nel mantenimento dell'omeostasi del tessuto cutaneo dell'adulto. La modulazione dell'attività di Itch potrebbe quindi avere un impatto nella chiusura della ferita. Questa osservazione è molto interessante e apre nuove aspetti nell'utilizzo di un inibitore specifico di Itch in quelle patologie in cui il riparo della ferita risulta essere rallentato, come ad esempio nei pazienti diabetici (Brem & Tomic-Camic, 2007). Un altro studio interessante sarebbe quello di caratterizzare le interazioni mesenchimali-epiteliali alla base del processo di chiusura della ferita.

Alterazioni nelle interazioni mesenchimali-epiteliali sono alla base di malattie umane come la psoriasi. La psoriasi è una delle più comuni forme di dermatite cronica. È una malattia infiammatoria non infettiva e solitamente recidiva. Le lesioni psoriasiche si presentano a livello istologico come zone di iperproliferazione, con una incompleta maturazione dei cheratinociti e

mantenimento dei nuclei nello strato corneo (paracheratosi), accompagnate da neovascolarizzazione e infiltrazione di linfociti nell'epidermide. In questo lavoro è stato dimostrato che la mancanza di Itch induce iperproliferazione delle cellule dello strato basale, per cui risulta logico ipotizzare che questa proteina possa avere un ruolo anche nell'eziologia della psoriasi. Studi futuri rivolti ad analizzare il contributo di Itch nello sviluppo di questa malattia saranno importanti per lo sviluppo di nuove terapie e farmaci in grado di contrastare questa patologia. In questo senso è stato dimostrato che l'espressione delle proteine AP-1, substrati di Itch, è implicata nello sviluppo della psoriasi (Zenz et al., 2005).

Un'altra applicazione dell'uso di questo modello murino sarebbe quella di determinare se Itch possa avere un ruolo nelle trasformazioni neoplastiche. Infatti, diversi regolatori trascrizionali, substrati di Itch, sono coinvolti in processi quali crescita cellulare, differenziamento e apoptosi (Melino et al., 2008).

MATERIALI E METODI

Animali

I topi *Itch*^{-/-} sono in un background C57BL10 come descritto prima (Parravicini et al., 2008). I topi eterozigoti per *Itch* sono stati incrociati per ottenere progenie *Itch*^{+/+}, *Itch*^{+/-} e *Itch*^{-/-}. Il genotipo dei topi è stato determinato attraverso PCR su DNA estratto dalle code degli animali utilizzando il kit Maxwell 16 Mouse Tail DNA Purification (Promega). Per identificare il gene *agouti* (presente solo nei topi WT) è stata eseguita la seguente reazione: 95°C x 3 min, 45 x (95°C x 30 s, 49°C x 1 min, 72°C x 45 s), 72°C x 5 min, utilizzando i primer mAgoF 5'-ttttgctctgacctgtaag-3' e mAgoR 5'-gaaggatcaaagggtgtaag-3'. Per identificare il gene mutato *itch* (presente solo nei topi *Itch*^{-/-}) è stata eseguita la seguente reazione: 95°C x 3 min, 45 x (95°C x 30 s, 57°C x 1 min, 72°C x 45 s), 72°C x 5 min, utilizzando i primer mAgoF 5'-ttttgctctgacctgtaag-3' e mItchR 5'-gaccacttagtgccag-3'.

Culture cellulari

I cheratinociti primari sono stati isolati dalla cute di topi appena nati (New Born, NB) (Yuspa et al., 1989). La cute, rimossa dal resto del corpo, è stata incubata in una soluzione contenente tripsina/EDTA per tutta la notte (Over Night, O/N) a 4°C. In seguito a digestione, l'epidermide è stata finemente triturrata e centrifugata per ottenere i cheratinociti murini. Per mantenere queste colture cellulari sono state utilizzate piastre collagenate e un terreno contenente 0.05 mM Ca²⁺, mentre per il differenziamento è stata utilizzata una concentrazione di calcio finale a 1.2 mM.

Istologia e immunofluorescenza

I tessuti sono stati fissati in paraformaldeide 4% e inclusi in paraffina. Le sezioni di uno spessore di 5 µm sono state quindi colorate con ematossilina/eosina o processate per l'analisi di immunofluorescenza.

Microscopia confocale

Dopo sparaffinazione (Histolemon), le sezioni sono state reidratate in soluzioni di alcool e acqua distillata. In seguito, i campioni sono stati bolliti per tre cicli da 5 min in microonde (300 W), in una soluzione di sodio citrato 0,01M a pH 6, allo scopo di promuovere l'esposizione dell'antigene. Per ridurre i fenomeni di autofluorescenza le sezioni sono state incubate O/N a 4°C in una soluzione 0,01M di tetraidroborato di sodio in PBS. Gli antigeni aspecifici sono stati bloccati tramite incubazione con una soluzione 10% di siero di capra in PBS per 2 h a RT. Le sezioni sono state incubate O/N con i seguenti anticorpi primari: anti-BrdU monoclonale (NCL-BrdU, Novocastra), anti-Ki67 monoclonale (NCL-Ki67p, Novocastra), anti-cheratina 14 murina (MK14) policlonale (PRB-155P, Covance), anti-cheratina 10 murina (MK10) policlonale (PRB-159P, Covance), anti-involucrina policlonale (PRB-140C, Covance), anti-loricrina policlonale (PRB-145P, Covance), anti-p63 monoclonale (MS-1084, Neomarkers), anti-cJun policlonale (SC-1694, Santa Cruz), anti-JunB policlonale (sc-46, Santa Cruz), anti-Notch policlonale (SC-6014, Santa Cruz). Le sezioni sono state lavate tre volte con PBS e quindi incubate per 1 ora con gli anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 488 o 568 (Molecular Probes). Dopo due lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 5 min con DAPI per colorare i nuclei e montate con un vetrino coprioggetto utilizzando il kit Prolong Antifade Kit (Invitrogen). La fluorescenza è stata analizzata con un microscopio confocale (Nikon, C1 su Eclipse TE200; EZC1 software) equipaggiato con un laser argon (eccitazione a 488 nm), un laser He/Ne (eccitazione a 542 nm) e diodo blu (eccitazione a 405 nm).

Misurazione dello spessore epidermico

La quantificazione dello spessore epidermico interfollicolare dei topi NB è stata effettuata misurando la distanza tra strato basale e strato granuloso. In ogni esperimento sono stati analizzati tre topi diversi per genotipo, misurando dieci regioni per topo.

Incorporazione della bromodeossiridina (BrdU)

Le tope incinte sono state iniettate intraperitoneo con una soluzione

contenente BrdU (50 mg/kg) 4 ore prima di sacrificarle. L'incorporazione della BrdU nell'epidermide interfollicolare è stata analizzata sugli embrioni al giorno di sviluppo embrionale 18.5 (E18.5). La quantificazione dell'incorporazione della BrdU è stata effettuata contando il numero di nuclei BrdU-positivi lungo una distanza lineare di 0,6 mm. In ogni esperimento sono stati analizzati tre topi diversi per genotipo, misurando dieci regioni diverse per topo.

Espressione dei substrati di Itch nell'epidermide

La quantificazione dell'espressione dei substrati di Itch nell'epidermide interfollicolare è stata effettuata misurando il numero di nuclei positivi all'anticorpo rispetto al numero di nuclei totale (per p63, cJun e JunB) o l'intensità media della colorazione (per Notch1). In ogni esperimento sono stati analizzati tre topi diversi per genotipo, misurando dieci regioni diverse per topo.

Saggio di formazione della barriera epidermica

La colorazione con il blu di toluidina degli embrioni è stata effettuata come precedentemente descritto (Hardman et al., 1998). Gli embrioni sono stati deidratati mediante incubazioni in soluzioni 25%, 50%, 75% e 100% di metanolo in PBS (1 min ciascuna). Gli embrioni sono stati quindi reidratati utilizzando la stessa serie di soluzioni, lavati in PBS e colorati per 1 min in 0.0125% blu di toluidina (Sigma) in PBS. Dopo lavaggio in PBS, gli embrioni sono stati fotografati.

Per il saggio di penetrazione del colorante Lucifer yellow (Invitrogen), il dorso dei topi NB è stato messo a contatto con una soluzione 1 mM del colorante in PBS a 37°C. Dopo 1 ora di incubazione i topi sono stati sacrificati e la cute del dorso è stata prelevata e inclusa in OCT (Thermo Scientific). Sezioni di 5 µm di spessore sono state quindi analizzate al microscopio.

Il saggio di formazione della barriera epidermica utilizzando la tecnica di biotinilazione è stato eseguito in accordo a un metodo sviluppato precedentemente (Chen et al., 1997). 50 µl di una soluzione 10 mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) in PBS, contenente 1 mM di CaCl₂, è stata iniettata sottocute nel dorso di topi NB. Dopo 30 min di incubazione, i

topi sono stati sacrificati e la cute, prelevata dal dorso, è stata inclusa in OCT. Sezioni di 5 µm di spessore sono state fissate in 95% etanolo a 4°C per 30 min e in seguito 100% acetone a RT per 1 min. Le sezioni sono state incubate bloccate in una soluzione 10% di siero di capra in PBS per 30 min e incubate con Streptavidin Texas red (Oncogene) per 30 min.

Esposizione ai raggi UVB

Il dorso di topi NB è stata irradiata con una dose 100 mJ/cm² di raggi UVB. Dopo 24 ore i topi sono stati sacrificati e la cute prelevata e incubata in OCT. Il saggio TUNEL è stato eseguito su sezioni di 5 µm di spessore, secondo le istruzioni del fornitore (Roche). La quantificazione delle cellule apoptotiche è stata effettuata contando il numero di nuclei TUNEL-positivi lungo una distanza lineare di 1 mm. In ogni esperimento sono stati analizzati tre topi diversi per genotipo, misurando dieci regioni diverse per topo.

Western blot

I cheratinociti primari murini sono stati lisati in un tampone contenente 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 1% SDS, 20 mM DTT e 5 mM EDTA. Gli estratti cellulari totali sono stati risolti in un gel di poliacrilammide SDS-10% e trasferiti su membrana PVDF (G&E Healthcare). Le membrane sono state bloccate con una soluzione blocking (5% latte, 0,1% Tween 20 in PBS), incubate con anticorpi primari per 2 ore a temperatura ambiente (Room Temperature, RT), lavate e ibridate per 1 ora a RT, utilizzando anticorpi secondari coniugati con HRP (BioRad). La rilevazione delle proteine è stata effettuata utilizzando il kit chemiluminescente ECL (Perkin Elmer). Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: anti-cheratina 5 murina (MK5) policlonale (PRB-160P, Covance), anti-cheratina 10 murina (MK10) policlonale (PRB-159P, Covance), anti-involucrina policlonale (PRB-140C, Covance), anti-p63 monoclonale (MS-1084, Neomarkers), anti-cJun monoclonale (610326, BD), anti-JunB policlonale (SC-73, Santa Cruz), anti-β-actin monoclonale (A5441, Sigma), anti-Itch monoclonale (611198, BD).

PCR real-time

L'RNA è stato estratto dai cheratinociti primari murini utilizzando il kit RNAeasy (Qiagen). 500 ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando il kit InPromII (Promega) e un decimo di ciascuna retrotrascrizione è stata utilizzata per la reazione di PCR. La reazione di PCR real-time è stata eseguita utilizzando Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG con Rox (Invitrogen), seguendo il seguente programma di amplificazione: 95°C x 3min, 40 x (94°C x 20 s, 60°C x 1 min). L'amplificazione è stata seguita da un protocollo di curva di appaiamento realizzata secondo le istruzioni dello strumento ABI 7500 (Applied Biosystems). I primer utilizzati sono i seguenti: mK5F 5'-tccagaacgccattgctgaag-3' e mK5R 5'-ccgtagccagaagagacactgtttg-3' (per la cheratina 5 murina); mK10F 5'-aggcttgggtggtgggattc-3' e mK10R 5'-gcattgtcagttgtcaggggtgagg-3' (per la cheratina 10 murina); mTG5F 5'-cagcccaggagccagaag-3' e mTG5R 5'-ggcctcggcggacaac-3' (per la transglutaminasi 5 murina); mInvF 5'-tctccctcctgtgagttgtttgg-3' e mInvR 5'-cagtgaagacctggcattgtgtagg-3' (per l'involucrina murina). La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione. I primer utilizzati sono: mActF 5'-tgtccctgtatgcctctgtgctg-3' e mActR 5'-gaaccgctcgttgccaatagt-3'. La quantificazione relativa dell'espressione genica è stata calcolata in accordo al metodo $\Delta\Delta CT$ descritto nel manuale ABI User Bulletin no. 2 (Applied Biosystems).

Ferite

Topi di 8 settimane di età sono stati anestetizzati e depilati sul dorso. Sulla cute precedentemente disinfettata con una garza imbevuta di etanolo 70%, è stata praticata una ferita escissionale con un punch del diametro di 6 mm nella parte mediana del dorso. L'area delle ferite è stata misurata il giorno dell'induzione delle lesioni, e successivamente, a intervalli di due giorni fino alla completa chiusura. I tracciati delle ferite, disegnati a mano su un lucido trasparente applicato direttamente sulla ferita ai vari tempi di misurazione, sono stati acquisiti come immagine al computer e la loro area è stata misurata mediante il sistema di analisi di immagine KS 300, versione 3.0 (Zeiss).

BIBLIOGRAFIA

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 2001 20:2413-2423.

Angers A, Ramjaun AR, McPherson PS. The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *J Biol Chem*. 2004 279:11471-11479.

Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu YC. Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Mol Cell*. 2004 15:825-831.

Bennett EJ, Shaler TA, Woodman B, Ryu KY, Zaitseva TS, Becker CH, Bates GP, Schulman H, Kopito RR. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*. 2007 448:704-708.

Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*. 2003 3:387-402.

Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell*. 2008 14:10-21.

Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev*. 2006 20:3022-3035.

Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell*. 2003 115:71-82.

Bouwstra JA, de Graaff A, Gooris GS, Nijse J, Wiechers JW, van Aelst AC. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol*. 2003 120:750-758.

Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007 117:1219-1222.

Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 6:328-340.

Candi E, Terrinoni A, Rufini A, Chikh A, Lena AM, Suzuki Y, Sayan BS, Knight RA, Melino G. p63 is upstream of IKK alpha in epidermal development. *J Cell Sci.* 2006 119:4617-4622.

Carroll DK, Carroll JS, Leong CO, Cheng F, Brown M, Mills AA, Brugge JS, Ellisen LW. p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006 8:551-561.

Casatorres J, Navarro JM, Blessing M, Jorcano JL. Analysis of the control of expression and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. Fundamental role of an AP-1 element. *J Biol Chem.* 1994 269:20489-20496.

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol.* 2004 122:1235-1244.

Chan T, Ghahary A, Demare J, Yang L, Iwashina T, Scott PG, Tredget EE. Development, characterization, and wound healing of the keratin 14 promoted transforming growth factor-beta1 transgenic mouse. *Wound Repair Regen.* 2002 10:177-187.

Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF alpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell.* 2006 124:601-613.

Chastagner P, Israël A, Brou C. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep.* 2006 7:1147-1153.

Chen YH, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol.* 1997 138:891-899.

Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 77:1365-1368.

Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994 79:13-21.

Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*. 1998 17:7151-7160.

Coscoy L, Ganem D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol*. 2003 13:7-12.

Courbard JR, Fiore F, Adélaïde J, Borg JP, Birnbaum D, Ollendorff V. Interaction between two ubiquitin-protein isopeptide ligases of different classes, CBLC and AIP4/ITCH. *J Biol Chem*. 2002 277:45267-45275.

Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*. 2006 281:10825-10838.

Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*. 1988 55:395-397.

Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hocheleid T, Ovaere P, Lippens S, Van den Broecke C, Van Damme P, D'Herde K, Hachem JP, Borgonie G, Presland RB, Schoonjans L, Libert C, Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandenaabeele P, Declercq W. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol*. 2007 9:666-674.

Di Fiore PP, Polo S, Hofmann K. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 4:491-497.

Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA, Alimandi M, Giannini G, Maroder M, Screpanti I, Gulino A. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol*. 2006 8:1415-1423.

DiSepio D, Jones A, Longley MA, Bundman D, Rothnagel JA, Roop DR. The proximal promoter of the mouse loricrin gene contains a functional AP-1 element and directs keratinocyte-specific but not differentiation-specific expression. *J Biol Chem*. 1995 270:10792-10799.

Dunn R, Klos DA, Adler AS, Hicke L. The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J Cell Biol*. 2004 165:135-144.

Eckert RL, Green H. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell*. 1986 46:583-589.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 3:859-868.

Egberts F, Heinrich M, Jensen JM, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M, Schunck M, Steude J, Saftig P, Proksch E, Schutze S. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci*. 2004 117:2295-2307.

Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol*. 2000 114:56-63.

Elias PM, Friend DS. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol*. 1975 65:180-191.

Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, Hunter T, Copeland N, Jenkins N, Liu YC. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol*. 2002 3:281-287.

Fang S, Weissman AM. A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*. 2004 61:1546-1561.

Finley D, Bartel B, Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*. 1989 338:394-401.

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

Forslind BA. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Ven Venereol*. 1994 74:1-6.

Freinkel RK, Traczyk TN. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol*. 1985 85:295-298.

Fuchs E. Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1990 2:1028-1035.

Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 2007 445:834-842.

Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103:1717-1722.

Gan SQ, Idler WW, McBride OW, Markova N, Steinert PM. The structure organization and polymorphism of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*. 1990 29:9432-9440.

Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science*. 2004 306:271-275.

Goldstein AM, Abramovitz W. Ceramides and the stratum corneum: structure, function and new methods to promote repair. *Int J Dermatol*. 2003 42:256-259.

Grayson S, Johnson-Winegar AG, Wintroub BU, Isseroff RR, Epstein EH Jr, Elias PM. Lamellar body-enriched fraction from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J Invest Dermatol*. 1985 85:289-294.

Grenfell SJ, Trausch-Azar JS, Handley-Gearhart PM, Ciechanover A, Schwartz AL. Nuclear localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, is cell-cycle-dependent. *Biochem J.* 1994 300:701-708.

Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, Lena AM, Candi E, Terrinoni A, Catani MV, Oren M, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Müller M. TAp63 alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.* 2005 24:2458-2471.

Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D, Mathon N, Knight RA, Melino G. Itch inhibition regulates chemosensitivity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 361:33-36.

Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C. Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development.* 1998 125:1541-1552.

Hartenstein B, Teurich S, Hess J, Schenkel J, Schorpp-Kistner M, Angel P. Th2cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *EMBO J.* 2002 21:6321-6329.

Harvey KF, Shearwin-Whyatt LM, Fotia A, Parton RG, Kumar S. N4WBP5, a potential target for ubiquitination by the Nedd4 family of proteins, is a novel Golgi-associated protein. *J Biol Chem.* 2002 277:93007-93017.

Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 76:3107-3110.

Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 2:195-201.

Hochstrasser M. Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science.* 2000 289:563-564.

Hohl D, Meherel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM. Characterization of human loricrin. *J Biol Chem.* 1991 266:6626-6636.

Holleran WV, Uchida Y, Halkier-Sorensen L, Harakate A, Hara M, Epstein JH, Elias PM. Consequences of β -glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alteration in Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994 93:1756-1764.

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 92:2563-2567.

Ihrie RA, Marques MR, Nguyen BT, Horner JS, Papazoglu C, Bronson RT, Mills AA, Attardi LD. Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell.* 2005 120:843-856.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG Jr. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000 407:645-648

Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003 194:237-255.

Jang SI, Steinert PM, Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem.* 1996 271:24105-24114.

Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Rossi SW, Anderson G. The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nat Rev Immunol.* 2006 6:551-555.

Jensen JM, Schutze S, Forl M, Kronke M, Proksch E. Role for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest.* 1999 104:1761-1770.

Jochum W, Passequé E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001 20:2401-2412.

Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem.* 1995 270:17442-17456.

Jones PH, Watt MF. Separation of human epidermal stem cells from transient amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*. 1993 73:713-724.

Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified envelope. *BioEssay*. 2002 24:789-800.

Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 3:893-905.

Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim KC, Dai X, Alegre ML, Fuchs E. GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev*. 2003 17:2108-2122.

Kee Y, Huibregtse JM. Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 354:329-333.

Kim SY, Bae CD. Calpain inhibitors reduce the cornified cell envelope formation by inhibiting proteolytic processing of transglutaminase 1. *Exp Mol Med*. 1998 30:257-262.

Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR. Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol*. 2000 151:389-400.

Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcriptionfactor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J*. 1999 18:420-432.

Li B, Chang CM, Yuan M, McKenna WG, Shu HK. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res*. 2003 63:7443-7450.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine

phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 275:1943-1947.

Liew FM, Yamanishi K. Regulation of transglutaminase 1 gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dexamethasone, and retinoic acid in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1992 202:310-315.

Lin A, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol*. 2003 13:107-14.

Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*. 2000 7:1218-1224.

Lissy NA, Davis PK, Irwin M, Kaelin WG, Dowdy SF. A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 2000 407:642-645.

Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 4:140-156.

Lu B, Rothnagel JA, Longley MA, Tsai SY, Roop DR. Differentiation-specific expression of human keratin 1 is mediated by a composite AP-1/steroid hormone element. *J Biol Chem*. 1994 269:7443-7449.

Ma S, Rao L, Freedberg IM, Blumenberg M. Transcriptional control of K5, K6, K14, and K17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr*. 1997 6:361-370.

Mack JW, Steven AC, Steinert PM. Mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments: the ionic zipper hypothesis. *J Mol Biol*. 1993 232:50-66.

Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003 121:231-241.

Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell*. 2003 5:709-722.

Markova N, Chipew CC, Marekov L, Idler WW, Steinert PM. Profilaggrin is major epidermal calcium binding protein. *Mol Cell Biol*. 1993 13:613-625.

Matesic LE, Haines DC, Copeland NG, Jenkins NA. Itch genetically interacts with Notch1 in a mouse autoimmune disease model. *Hum Mol Genet*. 2006 15:3485-3497.

Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H, Hashida M, Iizuka H, Ikawa M, Okabe M, Kondoh G, Kinoshita T, Takeda J, Yamanishi K. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 95:1044-1049.

McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*. 2003 278:23196-23203.

Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, Longley MA, Bundman D, Cheng C, Lichti U, Bisher ME, Steven AC, Steinert PM, Yupsa SH, Roop DR. Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*. 1990 61:1103-1112.

Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2002 2:605-615.

Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, Scialpi F, Malatesta M, Zocchi L, Browne G, Ciechanover A, Bernassola F. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ*. 2008 15:1103-1112.

Menon JK, Feingold KR, Elias PM. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol*. 1992 98:279-289.

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

Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*. 1996 106:989-992.

Miyachi Y, Yoshimura N, Suzuki S, Hamakubo T, Kannagi R, Imamura S, Murachi T. Biochemical demonstration and immunohistochemical localization of calpain in human skin. *J Invest Dermatol*. 1986 86:346-349.

Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A. 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*. 2006 281:38738-38747.

Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*. 2000 228:151-165.

Nagai Y, Kaneda S, Nomura K, Yasuda H, Seno T, Yamao F. Ubiquitin-activating enzyme, E1, is phosphorylated in mammalian cells by the protein kinase Cdc2. *J Cell Sci*. 1995 108:2145-52.

Nemes Z, Marekov LN, Steinert PM. Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. *J Biol Chem*. 1999a 274:11013-11021.

Nemes Z, Marekov LN, Fesus L, Steinert PM. A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain ω -hydroxyceramides to involucrin by ester bound formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999b 96:8402-8407.

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

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet.* 2003 33:416-421.

O'Keele EJ, Hamilton EH, Lee SC, Steinert PM. Trichoyalin: a structural protein of hair, tongue, nail and epidermis. *J Invest Dermatol.* 1993 101:65-71.

Oberst A, Malatesta M, Aqeilan RI, Rossi M, Salomoni P, Murillas R, Sharma P, Kuehn MR, Oren M, Croce CM, Bernassola F, Melino G. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 104:11280-11285.

Ohl MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Chazin WJ, Gould KL. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol.* 2003 10:250-255.

Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi di Vignano A, Lioumi M, Chiorino G, Tagami H, Woo M, Dotto GP. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell.* 2004 6:551-562.

Okuyama R, Ogawa E, Nagoshi H, Yabuki M, Kurihara A, Terui T, Aiba S, Obinata M, Tagami H, Ikawa S. p53 homologue, p51/p63, maintains the immaturity of keratinocyte stem cells by inhibiting Notch1 activity. *Oncogene.* 2007 26:4478-4488.

Oliver PM, Cao X, Worthen GS, Shi P, Briones N, MacLeod M, White J, Kirby P, Kappler J, Marrack P, Yang B. Ndfip1 protein promotes the function of itch ubiquitin ligase to prevent T cell activation and T-helper 2 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2006 25:929-940.

Osada M, Nagakawa Y, Park HL, Yamashita K, Wu G, Kim MS, Fomenkov A, Trink B, Sidransky D. p63-specific activation of the BPAG-1e promoter. *J Invest Dermatol.* 2005 125:52-60.

Osborne BA, Minter LM. Notch signaling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2007 7:64-75.

Parravicini V, Field AC, Tomlinson PD, Basson MA, Zamoyska R. Itch-/- alphabeta and gammadelta T cells independently contribute to autoimmunity in Itchy mice. *Blood*. 2008 111:4273-4282.

Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet*. 1998 18:143-146.

Petroski MD. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem*. 2008 9:1-7.

Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001 70:503-533.

Plewig G, Marples RR. Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. Part 1. *J Invest Dermatol*. 1970 54:13-18.

Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang H-Y, Elly C, Altman Y, Fang D, Hunter T, Liu YC. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2000 275:35734-35737.

Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J*. 2001 20:3427-3436.

Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 9:679-690.

Resing KA, Dale BA, Walsh KA. Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides. *Biochemistry*. 1985 24:4167-4175.

Resing KA, Dale BA, Walsh KA. Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry*. 1993 32:10036-10045.

Rice RH, Green H. The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked proteins. *Cell*. 1977 11:417-422.

Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G. The ubiquitinprotein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J*. 2005 24:836-848.

Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA, Croce CM, Melino G. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103:12753-12758.

Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 10:398-409.

Sade H, Krishna S, Sarin A. The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem*. 2004 279:2937-2944.

Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T. The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem*. 2002 277:719-724.

Saurat JM, Grosshans E, Laugier P, Lachapelle JM. *Dermatologie et venerologie* (Schalkwijk J, de Roo C, de Jongh GJ. Ed. Masson). 1991.

Scheffner M, Staub O. HECT E3s and human disease. *BMC Biochem*. 2007 8:1-6.

Schmuth M, Man MQ, Weber F, Gao W, Feingold KR, Fritsch P, Elias PM, Holleran WM. Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*. 2000 115:459-466.

Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2003 278:35857-35860.

Schwarz SE, Rosa JL, Scheffner M. Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *J Biol Chem.* 1998 273:12148-12154.

Serre G, Mils V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Réano A, Ouhayoun JP, Bettinger S, Soleilhavoup JP. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol.* 1991 97:1061-1072.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002 4:131-136.

Shearwin-Whyatt L, Dalton HE, Foot N, Kumar S. Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioassays.* 2006 28:617-628.

Sil AK, Maeda S, Sano Y, Roop DR, Karin M. IkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature.* 2004 428:660-664.

Simon M. The epidermal cornified envelope and its precursors. In *The Keratinocyte Handbook* (Leigh IM, Lane EB, Watt FM eds). 1994.

Simon M, Bernard D, Minondo AM, Camus C, Fiat F, Corcuff P, Schmidt R, Serre G. Persistence of both peripheral and non-peripheral corneodesmosomes in the upper stratum corneum of winter xerosis skin versus only peripheral in normal skin. *J Invest Dermatol.* 2001 116:23-30.

Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 78:4097-4101.

Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide crosslinked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 1995 270:17702-17711.

Steinert PM, Candi E, Kartasova T, Marekov LN. Small prolinerich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *J Struct Biol.* 1998 122:76-85.

Steinert PM, Candi E, Tarcsa E, Marekov LN, Sette M, Paci M, Ciani B, Guerrieri P, Melino G. Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell Death Diff.* 1999 6:916-930.

Su V, Lau AF. Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. *Cell Mol Life Sci.* 2009 66:2819-2833.

Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol.* 1998 8:1169-1178.

Suzuki A, Itami S, Ohishi M, Hamada K, Inoue T, Komazawa N, Senoo H, Sasaki T, Takeda J, Manabe M, Mak TW, Nakano T. Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res.* 2003 63:674-681.

Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1989 92:251-257.

Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell.* 2000 103:745-755.

Thanos CD, Bowie JU. p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci.* 1999 8:1708-1710.

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 1997 387:673-676.

Vauclair S, Nicolas M, Barrandon Y, Radtke F. Notch1 is essential for postnatal hair follicle development and homeostasis. *Dev Biol.* 2005 284:184-193.

Viganò MA, Lamartine J, Testoni B, Merico D, Alotto D, Castagnoli C, Robert A, Candi E, Melino G, Gidrol X, Mantovani R. New p63 targets in keratinocytes identified by a genome-wide approach. *EMBO J.* 2006 25:5105-5116.

Wang C, Xi J, Begley TP, Nicholson LK. Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. *Nat Struct Biol.* 2001 8:47-51.

Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 2002 21:3919-3926.

Wegierski T, Hill K, Schaefer M, Walz G. The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. *EMBO J.* 2006 25:5659-5669.

Welter JF, Crish JF, Agarwal C, Eckert RL. Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *J Biol Chem.* 1995 270:12614-12622.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003 83:835-870.

Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol.* 2003 23:2264-2276.

Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 1980 255:7529-7532.

Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.* 2007 2:11.

Wojcik SM, Bundman DS, Roop DR. Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2000 20:5248-5255.

Yaffe MB, Beegen H, Eckert RL. Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem.* 1992 267:12233-12238.

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

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

Yang C, Zhou W, Jeon MS, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, Liu YC. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol Cell.* 2006 21:135-141.

Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature.* 2008 452:225-230.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol.* 1989 109:1207-1217.

Zenz R, Scheuch H, Martin P, Frank C, Eferl R, Kenner L, Sibilina M, Wagner EF. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev Cell.* 2003 4:879-889.

Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005 437:369-375.

Zenz R, Wagner EF. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 38:1043-1049.

CURRICULUM VITAE

INFORMAZIONI PERSONALI

Nome	ALESSANDRO GIAMBOI MIRAGLIA
Indirizzo	Via Andrea Del Castagno 108, 00142, Roma, Italia
Telefono	+39 3389450647
E-mail	alexgiamboi@hotmail.com
Cittadinanza	Italiana
Data di nascita	07/01/1983

ESPERIENZA LAVORATIVA

Date	10/2006-1/2010
Nome e indirizzo del datore di lavoro	Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Via Montpellier 1, 00133, Roma
Tipo di azienda o settore	Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche
Tipo di impiego	Dottorato di Ricerca
Principali mansioni e responsabilità	Tecniche di Biologia Molecolare e Cellulare
Date	01/2004-06/2006
Nome e indirizzo del datore di lavoro	Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Margherita 299, 00161, Roma
Tipo di azienda o settore	Dipartimento del Farmaco
Tipo di impiego	Tirocinio formativo
Principali mansioni e responsabilità	Tecniche di Biologia Molecolare e Cellulare

ISTRUZIONE E FORMAZIONE

Date	10/2006-01/2010
Nome e tipo di istituto di istruzione o formazione	Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Facoltà di Medicina e Chirurgia
Principali materie / abilità professionali oggetto dello studio	Biochimica, Biologia Molecolare, Biologia Cellulare
Qualifica conseguita	Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare
Livello nella classificazione nazionale	Dottorato di Ricerca
Date	10/2000-02/2006
Nome e tipo di istituto di istruzione o formazione	Università degli Studi di Roma La Sapienza, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Corso di Laurea in Scienze Biologiche
Principali materie / abilità professionali oggetto dello studio	Biologia Cellulare, Biochimica, Biologia Molecolare, Biologia dello Sviluppo, Fisiologia, Microbiologia, Biotecnologie
Qualifica conseguita e votazione	Laurea in Scienze Biologiche 110/110 e lode
Livello nella classificazione nazionale	Laurea Vecchio Ordinamento
Date	10/1994-07/1999
Nome e tipo di istituto di istruzione o formazione	Istituto Educativo Nueva Esparta, Porlamar, Isla de Margarita, Venezuela
Principali materie / abilità professionali oggetto dello studio	Castigliano, Matematica, Scienze Chimiche e Biologiche, Lingua Inglese
Qualifica conseguita e votazione	Diploma di Maturità Scientifica 88/100
Livello nella classificazione nazionale	Diploma di Scuola Secondaria Superiore

**CAPACITÀ E COMPETENZE
PERSONALI**

MADRELINGUA

ITALIANO

ALTRE LINGUE

	INGLESE
Capacità di lettura	BUONO
Capacità di scrittura	BUONO
Capacità di espressione orale	BUONO

	SPAGNOLO
Capacità di lettura	ECCELLENTE
Capacità di scrittura	ECCELLENTE
Capacità di espressione orale	ECCELLENTE

**CAPACITÀ E COMPETENZE
TECNICHE**

Tecniche di laboratorio: colture cellulari, immunoistochimica, microscopia confocale, manipolazione di acidi nucleici e proteine, mantenimento e cura di colonie murine, manipolazione di embrioni ed organi murini.

**CAPACITÀ E COMPETENZE
INFORMATICHE**

Ottima conoscenza dei sistemi operativi Windows e Mac OS. Ottima capacità di utilizzo dei diversi applicativi del pacchetto Office.

**PUBBLICAZIONI
SCIENTIFICHE**

Candi, E., Rufini, A., Terrinoni, A., **Giamboi-Miraglia, A.**, Lena, AM., Mantovani, R., Knight, R., and Melino, G. (2007) DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of FgfR2 and Jag2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 11999-112004.

Miraglia, AG., Travaglione, S., Meschini, S., Falzano, L., Matarrese, P., Quaranta, MG., Viora, M., Fiorentini, C., and Fabbri A. (2007) Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* 18: 2735-2744.

Giamboi-Miraglia, A., Travaglione, S., Filippini, P., Fabbri, A., Fiorentini, C., and Falzano L. (2006) A multinucleating *Escherichia coli* cytotoxic perturbs cell cycle in cultured epithelial cells. *Toxicol. In Vitro* 21: 235-239.

Falzano, L., Filippini, P., Travaglione, S., **Miraglia, AG.**, Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2006) *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G₂/M transition in uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 74: 3765-3772.

Travaglione, S., Falzano, L., **Giamboi Miraglia, A.**, Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2006) Cytotoxic necrotizing factor I from pathogenic *Escherichia coli*: A risky road toward inflammation and cancer? In *Crossroads Between Bacterial Protein Toxins and Host Cell Defences*. ISBN: 7895-202-5.