



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

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE**

XXI CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

**Regolazione del fattore trascrizionale p73 da parte del complesso E3
ubiquitina ligasi CDL4a e della proteina N4BP1**

Martina Malatesta

Relatore: ***Dott.ssa Francesca Bernassola***

Docente Guida: ***Prof. Gerry Melino***

Coordinatore: ***Prof. Giorgio Federici***

A.A. 2008/2009

INDICE

INDICE	I
RINGRAZIAMENTI	III
RIASSUNTO	IV
ABSTRACT	VII
PAROLE CHIAVE	X
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Generalità delle proteine appartenenti alla famiglia dell'oncosoppressore p53	1
1.2 Architettura genica della famiglia p53	3
1.3 Funzioni biologiche di p73	5
1.3.1 Ruolo di p73 nella regolazione della morte cellulare per apoptosi	5
1.3.2. Ruolo di p73 nello sviluppo embrionale e nel differenziamento	8
1.3.3 Ruolo di p73 nella tumorigenesi	9
1.3.4. Ruolo di p73 nella chemio sensibilità	12
1.4 Regolazione di p73	13
1.4.1 Regolazione trascrizionale di p73	13
1.4.2 Regolazione post-traduzionale di p73	14
Fosforilazione	15
Acetilazione	16
Sumoilazione	16
1.5 La reazione di ubiquitinazione	17
1.5.1 Generalità della cascata enzimatica dell'ubiquitinazione	17
1.5.2 Differenti tipi di ubiquitinazione e loro significato biologico	19
1.5.3 Enzimi coinvolti nella reazione di ubiquitinazione	22
1.5.4 Le E3 ubiquitina ligasi	23
E3 di tipo HECT	23
E3 di tipo RING-finger	29
E3 di tipo U-Box	41
1.5.5 Ubiquitinazione di p73	42
2.SCOPO DEL LAVORO	45
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 Colture cellulari, plasmidi e condizioni di trasfezione:	47
3.2 Analisi di immunoblotting e immunoprecipitazioni:	47
3.3 Determinazione dell'emivita proteica:	48
3.4 Studi di si-RNA:	49
3.5 Saggio di luciferasi:	49
3.6 Saggi di legame <i>in vitro</i> :	50
3.7 Saggio di competizione <i>in vitro</i> :	50
3.8 Saggio di ubiquitinazione <i>in vivo</i> :	51
3.9 Saggio di ubiquitinazione <i>in vitro</i> :	51
3.10 Infezione retrovirale :	52
3.11 Reazione di RT-PCR semiquantitativa e di real-time PCR (qPCR):	52
4. RISULTATI	54
4.1 Premessa ai risultati	54
4.2 La proteina N4BP1 regola la stabilità dei substrati di Itch.	55

4.2.1 L'assenza di N4BP1 induce i livelli proteici di p73.....	55
4.2.2 L'overespressione di N4BP1 aumenta la stabilità di p73.....	58
4.2.3 N4BP1 regola l'attività trascrizionale di p73 e di c-Jun.....	59
4.2.4 N4BP1 compete con p73 per il legame con il dominio WW2 di Itch	62
4.3 L'E3 ubiquitina ligasi CDL4a interagisce, multiubiquitina e controlla l'attività trascrizionale di p73	66
4.3.1 p73 interagisce con CDL4a tramite un legame diretto con DDB1.....	66
4.3.2 CDL4a multi-ubiquitina p73	71
4.3.3 CDL4A non influenza la stabilità di p73.....	74
5. DISCUSSIONE.....	84
5.1 Ruolo di N4BP1 nella regolazione di Itch e dei suoi substrati	85
5.2 Ruolo di CDL4a nella regolazione dell'attività trascrizionale di p73.....	88
ELENCO ABBREVIAZIONI.....	91
BIBLIOGRAFIA.....	93
CURRICULUM VITAE	117
PUBBLICAZIONI	120

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Gerry Melino per avermi dato la possibilità di svolgere l'attività di ricerca finalizzata alla mia tesi di dottorato nel suo laboratorio. Un ringraziamento è rivolto alla Dott.ssa Francesca Bernassola che quotidianamente ha seguito il mio lavoro di tesi dandomi preziosi consigli. Desidero ringraziare il Dott. Vincenzo De Laurenzi, la Dott.ssa Eleonora Candi e il Dott. Alessandro Terrinoni per le discussioni scientifiche e gli utili suggerimenti. Un ringraziamento va al Dott. Angelo Peschiaroli per l'aiuto, i suggerimenti, i consigli costanti che mi ha fornito e per avermi trasmesso una parte del suo forte spirito critico.

Un ringraziamento particolare lo rivolgo ora a tutti coloro che ho incontrato in questi anni trascorsi nel laboratorio. Nello specifico un ringraziamento particolare va ad uno dei punti di riferimento del laboratorio AnnaMaria e alla sua estrema disponibilità nell'affrontare questioni scientifiche e non e per avermi trasmesso la dote della praticità e della genuinità e non da meno per tutte le gite, gli agriturismi, i weekendini passati insieme. Un grazie va ad un'altra colonna del laboratorio: il nostro tuttofare-terrorista buono Marco teorico del "si può fare però..." nonchè fan delle levatacce...Continuando per "anzianità" un grazie va al mio "pungiball" preferito Andrea e a tutti i "no" e le capocciate sopportate e non di meno alle serate e alle gite goliardiche fatte insieme. Come non ringraziare Loredana per il suo entusiasmo e per le lunghissime chiacchierate fatte insieme...Ed ora un ringraziamento va al mio "alter ego", la mia "Crock" Flavietta per avermi insegnato, ascoltato, consigliato, sopportato e supportato quotidianamente in lab e fuori. Ringrazio anche Alessandro "Rufus" per l'aiuto iniziale e per le uscite e le gite fatte insieme.

Ed ora arriviamo alle "creature" del lab ringrazio i miei "magazzinieri" preferiti: Ivano per la schiettezza e l'ironia napoletana e Ale per l'estrema disponibilità. Grazie anche a Pia per la trasferta toscana, a Antonella per le chiacchiere mondane, a Valeria per aver cercato di mettere ordine nel nostro delirio... Un ringraziamento va anche alla piccolina del lab Eleonora per avermi aiutato in un po' di lavori noiosetti...Passando ai piani alti un grazie va a Lucilla per le giornate interminabili trascorse in D27, a Maura, Margherita, Manuela e al mitico Vongher per l'estrema pazienza e a tutti coloro che ho avuto modo di conoscere in questi anni.

Infine un ringraziamento particolare va alla mia famiglia a Claudia, a Delia e a Bera per avermi sostenuto e soprattutto sopportato in questo periodo.

RIASSUNTO

Il fattore di trascrizione p73 appartiene alla famiglia di p53. Similmente a p53, p73 è costituito da un dominio di trans-attivazione (TA) posizionato all'estremità amino-terminale della proteina, da un dominio di legame al DNA (DBD) situato nella regione centrale e da un dominio di oligomerizzazione (OD) sito all'estremità carbossi-terminale. La regione con la più elevata omologia tra p73 e p53 risulta essere il DBD, che evidenzia una percentuale del 63% di identità aminoacidica tra le due proteine. Questo dato sottolinea la capacità di p73 di poter interagire con gli stessi elementi responsivi (RE) di p53, situati nei promotori dei suoi geni bersaglio. In conseguenza di ciò p73 può transattivare numerosi geni comunemente indotti da p53 e coinvolti nella risposta apoptotica o nella regolazione del ciclo cellulare.

L'espressione di p73, così come quella di p53, è regolata a livello traduzionale. In particolare p73 è bersaglio di numerose modificazioni traduzionali quali fosforilazione, acetilazione, sumoilazione e ubiquitinazione.

In particolare in questo lavoro di tesi ci concentreremo sul ruolo dell'ubiquitinazione di p73 nella regolazione della sua attività biologica.

L'ubiquitinazione è un processo che avviene in tre diverse fasi ciascuna catalizzata dall'azione di un diverso enzima: la prima fase è catalizzata dall'enzima E1 (enzima attivatore) ed è preposta all'attivazione dell'ubiquitina tramite un meccanismo dipendente dall'utilizzo di ATP. La seconda fase è invece catalizzata dall'enzima di coniugazione E2, in grado di ricevere l'ubiquitina precedentemente attivata e di trasferirla all'enzima E3 ubiquitina ligasi. Quest'ultimo enzima catalizza il trasferimento finale dell'ubiquitina attivata ai substrati della reazione.

La specificità del processo di ubiquitinazione è conferita dall'azione dell'E3 ligasi. Questo enzima è infatti in grado di interagire con l'E2 e di reclutare i diversi substrati specifici. L'E3 ligasi sono divise in due famiglie principali: le E3 di tipo HECT e le E3 di tipo RING-finger. Quest'ultime sono a loro volta suddivise in RING-finger monomeriche e RING-finger multimeriche. Le HECT ligasi mostrano una struttura modulare comune costituita da tre domini funzionali. All'estremità N-terminale il dominio di legame al calcio (C2) è necessario per l'interazione alle membrane, mentre il legame ai diversi substrati della ligasi è mediato da diversi domini WW posizionati nella

regione centrale. Infine il dominio HECT situato all'estremità C-terminale lega l'enzima E2 e contiene il residuo di cisteina catalitica che è responsabile del trasferimento dell'ubiquitina dall'E2 al substrato specifico.

Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente dimostrato come Itch, una E3 ubiquitina ligasi di tipo HECT sia responsabile dell'ubiquitinazione di p73. In particolare, verificando la capacità di Itch di promuovere la poliubiquitinazione di p73 e la sua successiva degradazione ad opera del proteosoma. Recentemente, abbiamo identificato la proteina Nedd4 binding protein 4 (N4BP1), precedentemente dimostrata essere un substrato del prototipo delle HECT ligasi Nedd4, come nuovo interattore di Itch, in grado di regolarne negativamente la sua attività.

Nella prima parte del mio lavoro di tesi ci siamo occupati di approfondire i meccanismi alla base dell'interazione tra N4BP1 e Itch e di evidenziarne il significato funzionale.

N4BP1 interagisce con la regione centrale di Itch contenente i domini WW, in particolare con il secondo dominio WW (WW2). Tale dominio è comunemente utilizzato per il legame con i diversi substrati di Itch, ed infatti anche p73 interagisce con la medesima regione. Suggestendo che N4BP1 possa competere per il legame su Itch con i suoi substrati.

Tramite esperimenti di legame *in vitro* abbiamo effettivamente dimostrato che N4BP1 e p73 competono per il legame allo stesso sito su Itch.

Questo meccanismo di competizione si riflette con i dati fisiologici ottenuti che attestano un ruolo indiretto di N4BP1 nella regolazione della stabilità di p73 e dei suoi substrati. Esperimenti condotti in assenza di N4BP1, ottenuta mediante knock out genetico o attraverso silenziamento per RNAi, mostrano una forte diminuzione dei livelli proteici di p73 e dei vari substrati di Itch. Inoltre la capacità di p73 di transattivare i suoi geni bersaglio è fortemente ridotta in assenza di N4BP1. In maniera reciproca, l'overespressione di N4BP1 aumenta la vita media di p73 e dei substrati di Itch ed inoltre provoca un incremento dell'attività trascrizionale dei substrati di Itch: p73 e c-Jun.

Questi risultati identificano N4BP1 come regolatore negativo di Itch, in grado di modulare la stabilità e la funzionalità di diversi substrati di Itch.

La seconda parte del lavoro di tesi è stata finalizzata alla comprensione del significato funzionale e fisiologico del legame tra p73 e la ligasi E3 RING-finger CDL4a.

CDL4a è un complesso multimerico costituito dalla proteina ROC1, contenente il dominio RING-finger e responsabile dell'interazione con l'E2, dalla proteina cul4a che funziona come un adattatore molecolare facilitando il trasferimento dell'ubiquitina dall'E2 ai vari substrati, e dal fattore DDB1 responsabile del reclutamento dei diversi substrati o tramite un'interazione diretta con questi ultimi o attraverso un legame con proteine contenenti il dominio WD40.

Tramite esperimenti di legame *in vitro* e co-IP *in vivo* abbiamo dimostrato che p73 interagisce con CDL4a attraverso un legame diretto con DDB1. L'interazione tra p73 e la ligasi è fondamentale per l'ubiquitinazione di p73. Abbiamo infatti verificato che CDL4a è in grado di multiubiquitinare p73. Poiché dalla letteratura è noto che la reazione di multi-ubiquitinazione non regola la degradazione proteica proteosoma-dipendente, abbiamo monitorato i livelli proteici di p73 in cellule deplete per DDB1 e per la cul4a. L'ablazione dei componenti del complesso CDL4a ottenuta tramite RNAi o tramite delezione genetica, non determina alcuna variazione della stabilità di p73. Inoltre anche l'emivita di p73 non subisce alcuna modulazione in seguito ad overespressione dei componenti di CDL4a. Infine abbiamo dimostrato che la multiubiquitinazione di p73 CDL4a-dipendente inibisce l'attività trascrizionale di p73. Questo effetto è stato confermato dall'aumentata induzione dei messaggeri e delle proteine dei geni bersaglio di p73 in assenza di DDB1 o di cul4a.

I risultati ottenuti mostrano due differenti meccanismi di regolazione di p73 entrambi mediati dalla reazione di ubiquitinazione. N4BP1 inibendo Itch, esercita indirettamente un ruolo di regolatore positivo nei confronti di p73, mentre CDL4a multiubiquitina p73 e ne regola negativamente l'attività trascrizionale.

Studi futuri potrebbero essere indirizzati verso una migliore comprensione del ruolo svolto da entrambi N4BP1 e CDL4a nella regolazione del ciclo cellulare, nell'induzione apoptotica e nella progressione tumorale.

ABSTRACT

p73 is a structural and functional homolog of the tumor suppressing transcriptional factor p53. p73 and p53 are modular proteins with a similar basic structure formed by a transactivation domain (TA) situated at N-terminus of the protein, a DNA binding domain (DBD) in the central part of the protein and an oligodimerization domain (OD) at C-terminus of the factor. The core DNA binding domain is the region which shares the highest homology between p73 and p53. Consequently p73 can bind to canonical p53 DNA-binding site and activate transcription from p53-responsive promoters, thus inducing cell cycle arrest and apoptosis.

p73 activity is finely regulated by different post-translational modifications including phosphorylation, acetylation, sumoylation and ubiquitination. In this thesis we have focused our attention on the role of ubiquitin partners in the regulation of p73.

Ubiquitination is a multi-step process which involves sequentially three different kind of enzyme: the E1-activating enzyme responsible for the activation of the ubiquitin through an ATP-dependent mechanism, the E2-conjugating enzyme which receives directly from the E1 the activated ubiquitin and the E3 ubiquitin ligase enzyme which physically binds specific substrates and transfers the activated ubiquitin from the E2 to the target proteins. So the specificity of the reaction of ubiquitination is conferred by the activity of the E3 ligase.

The E3 ligase are divided into two major groups: the RING-finger ligase and the HECT ligase. The RING finger are also subdivided into two subgroups: the monomeric RING-ligase and the multimeric RING ligase.

The HECT ligase are constituted by a C2 domain at N-terminus of the protein, which is a calcium-lipid domain responsible for the interaction with the membrane, different WW domains in the central part which serve for the binding of the different substrates and an HECT domain at the C-terminus involved in the recruitment of the E2 enzyme. Furthermore the HECT domain contains the Cys catalitical residue responsible for the binding with the activated ubiquitin.

In our laboratory we previously identified Itch as the HECT-type E3 ubiquitin ligase of p73 responsible for the proteosomal-dependent degradation. Recently we

identified the protein N4BP1, which is first identified as a novel substrate of the E3 HECT ligase Nedd4, as a new interactor of Itch.

In the first part of the project we investigated the mechanism of action of N4BP1 and the physiological significance of its function.

We found that N4BP1, as p73, binds to WW2 domain of Itch, a region involved in the interaction with its substrates. This suggest that N4BP1 could compete with Itch substrates for the binding to the ligase. By performing an *in vitro* binding assay, we indeed demonstrated that N4BP1 acts as a competitor of p73.

As a consequence the overexpression of N4BP1 increases both the p73 half-life and the transcriptional activity. Conversely genetic and RNAi knockdown of N4BP1 diminish the steady-state protein levels of p73 and c-Jun, and significantly impair their transcriptional activity.

These results demonstrate that N4BP1 functions as a negative regulator of Itch and this activity is reflected on stabilization of the cell death regulator p73.

The second part of my project has been focused on the characterization of the significance of the interaction between p73 and CDL4a.

CDL4a is a multimeric complex constituted by cul4a, ROC1 e DDB1. ROC1 is a RING-finger protein which recruits the E2 enzyme, cul4a interacts with ROC1 and acts as a scaffold protein orienting the E2 enzyme versus the different substrates. The substrates are recruited or directly by DDB1 or conversely the interaction could be mediated by a WD40 protein which binds DDB1.

By GST pulldown assay *in vitro* and CO-IP experiments *in vivo*, we demonstrated that p73 binds to CDL4a through a direct interaction with DDB1. Moreover CDL4a mediates the multiubiquitilation of p73 on different residue of lysine. It's well established that the multiubiquitination of a target protein, is not a signal for a proteosomal-dependent degradation. Therefore, we hypothesized that the multiubiquitilation of p73, CDL4a mediated, doesn't effect its protein stability. To confirm this, we measured p73 protein levels in cells depleted for DDB1 or cul4a. We showed that genetic and RNAi knockdown of DDB1 or of Cul4a, obtained from different strategies, don't exert any effect on stability of p73. In agreement with this datas p73 decay rate is not even affected by the overexpression of the different members of the CDL4a.

Finally we demonstrated that CDL4a inhibits the transcriptional activity of p73. In particular RNA mediated silencing or genetic knockdown of the different members of CDL4a induce an activation of different target genes of p73.

These results highlighted two different ubiquitin-mediated pathways which regulates p73 stability, function and activity. N4BP1 acts as an indirect positive regulator of p73 while CDL4a multiubiquitinates p73 and negatively regulates p73 transcriptional activity. Future studies will be necessary to understand the contribution of both CDL4a and N4BP1 in regulating cell cycle, apoptosis and cancer development.

PAROLE CHIAVE

Attività trascrizionale, complesso CDL4a, E3 ubiquitina ligasi, Itch, N4BP1, p73, ubiquitinazione.

1. INTRODUZIONE

1.1 Generalità delle proteine appartenenti alla famiglia dell'oncosoppressore p53

Il gene *p53* codifica per un fattore trascrizionale antitumorale, comunemente definito “guardiano del genoma” a causa del suo ruolo centrale esercitato in risposta a stimoli oncogenici ed a stress citotossici quali il danno al DNA. La sua attivazione in risposta a questi eventi determina l'induzione trascrizionale di diversi geni bersaglio coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione dell'apoptosi, della senescenza cellulare e dei meccanismi di riparo del DNA (Vousden, 2000; Harms et al., 2004; Harris and Levine, 2005; Mashima and Tsuruo, 2005; Green and Chipuk, 2006).

Nel 1997 sono stati identificati due nuovi membri della famiglia di p53: p73 (Kaghad et al., 1997) e p63 (Yang et al., 1998; Schmale and Bamberger, 1997; Osada et al., 1998; Trink et al., 1998; Zeng et al., 2001.)

Questi due nuovi fattori di trascrizione mostrano un elevato grado d'omologia con la sequenza genica di p53, che si riflette in un elevato grado di identità tra le tre proteine (Yang and McKeon, 2000; Yang et al., 2002, Irwin and Kaelin, 2001; Levrero et al., 2000). Inoltre, i membri di questa famiglia condividono una comune struttura modulare che consiste di un dominio di transattivazione (transactivation domain, TAD) posto all'estremità N-terminale, un dominio di legame al DNA (DNA binding domain, DBD) situato nella porzione centrale ed un dominio di oligomerizzazione (oligomerization domain, OD) contenuto nella regione C-terminale (Figura 1A).

A queste somiglianze strutturali corrisponde una ridondanza funzionale tra i diversi membri della famiglia; infatti p73 e p63 svolgono funzioni ed attività simili a quelle esercitate da p53 essendo anch'esse coinvolte nella regolazione dell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione dell'apoptosi (Figura 1B).

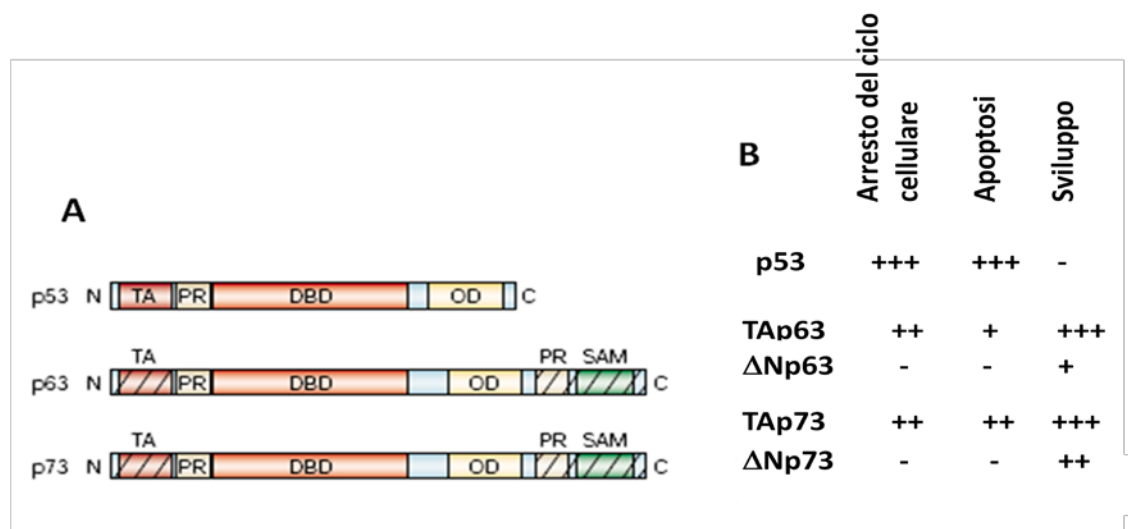


Figura 1: I membri della famiglia di p53. a) *p53*, *p63* e *p73* mostrano una comune struttura altamente conservata costituita da un dominio di transattivazione (TA) posto all'estremità N-terminale seguito da un dominio ricco in proline (PR), da un dominio di legame al DNA (DBD) posizionato nella regione centrale e un dominio di oligodimerizzazione (OD) situato all'estremità C-terminale. In aggiunta *p63* e *p73* possiedono un altro dominio PR e un dominio denominato SAM (sterile alpha motif) all'estremità carbossi-terminale. b) Schema riassuntivo delle diverse funzioni esercitate dalle tre proteine p53, p63 e p73: p53 risulta di fondamentale importanza nell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione apoptotica. Sia TAp63 che TAp73 sono in grado di transattivare gli stessi geni bersaglio di p53 e di conseguenza anch'essi svolgono un ruolo nell'induzione dell'arresto del ciclo e dell'apoptosi. Le varie isoforme di p73 e p63 sono coinvolte nei processi di sviluppo. (Melino et al., 2002)

Tuttavia le due proteine svolgono anche funzioni specifiche distinte da p53: studi condotti su topi in cui *p73* o *p63* sono stati deleti, mostrano che l'espressione di questi geni è importante per il corretto sviluppo dell'organismo. La perdita del gene codificante per p63 provoca varie alterazioni strutturali quali la completa assenza di pelle e di altre strutture epiteliali (Candi et al., 2005), la perdita di arti (Yang et al., 1998, 1999, 2002; Mills et al., 1999) e gravi displasie craniofacciali (Yang et al., 1999; Mills et al., 1999; Celli et al., 1999). La mancanza del gene *p73*, determina invece gravi difetti di sviluppo che causano disgenesesi dell'ippocampo, idrocefalia, infezioni ed infiammazioni croniche ed anomalie nel corretto funzionamento dei feromoni (Yang et al., 1999, 2000, 2002).

Queste evidenze dimostrano quindi che i membri della famiglia di p53 svolgono precise funzioni in diversi processi coinvolti sia nello sviluppo che nella tumorigenesi. Risulta quindi rilevante identificare le vie regolazione che ne controllano l'attività trascrizionale.

1.2 Architettura genica della famiglia p53

La struttura genica di TP53, TP63 e di TP73 è altamente conservata dai molluschi all'uomo. Attraverso l'allineamento delle tre sequenze geniche, è stata stabilita l'esistenza di un protogene ancestrale, simile a TP63/TP73, da cui successivamente si sarebbe evoluto negli organismi superiori il gene codificante per il fattore di trascrizione p53. (Yang et al., 2002; Derry et al., 2001; Brodsky et al., 2000; Ollmann et al., 2000).

I domini strutturali introdotti precedentemente mostrano un elevato grado di omologia tra i vari membri della famiglia. La regione maggiormente conservata è il DBD che mostra il 63% di omologia tra p73 e p53 ed il 60% di omologia tra p63 e p53. Questo spiega la capacità di p73 e di p63 di interagire con i medesimi siti canonici di legame di p53, e la conseguente transattivazione dei promotori ad essi associati. (De Laurenzi and Melino, 2000).

Attraverso il dominio OD le proteine p73 e p63 sono in grado di formare omo ed eterodimeri sia tra di loro sia con p53.

p63 e p73 inoltre contengono all'estremità carbossi-terminale un ulteriore dominio di interazione proteina-proteina, costituito da un motivo SAM (Sterile Alpha Motif). Questo particolare dominio è implicato nell'interazione tra proteine coinvolte nello sviluppo embrionale e può mediare l'interazione con lipidi di membrana (Thanos and Bowie., 1999; Chi et al., 1999; Arrowsmith, 1999; Barrera et al., 2003).

L'espressione di TP63 e TP73 è regolata da due distinti promotori: il promotore 1 (P1) localizzato nella regione non tradotta all'estremità 5', a monte dell'esone 1, ed il promotore 2 (P2) situato nell'introne 3. I due promotori sono responsabili della sintesi di due classi distinte di proteine divisibili nelle isoforme trascrizionalmente attive (transcriptionally active, TA) e nelle isoforme troncate di tipo ΔN (Figura 2). Queste ultime sono prive della regione all'estremità N-terminale e non contengono il TAD risultando quindi incapaci di transattivare l'espressione dei geni target. Inoltre l'esone 1 può subire eventi di splicing responsabili della generazione di altre isoforme prive del TAD (ΔN 'p73, ExDelp73 e Ex2/3Delp73) (Stiewe and Putzer., 2002; Fillippovich et al., 2001; Ishimoto et al., 2002).

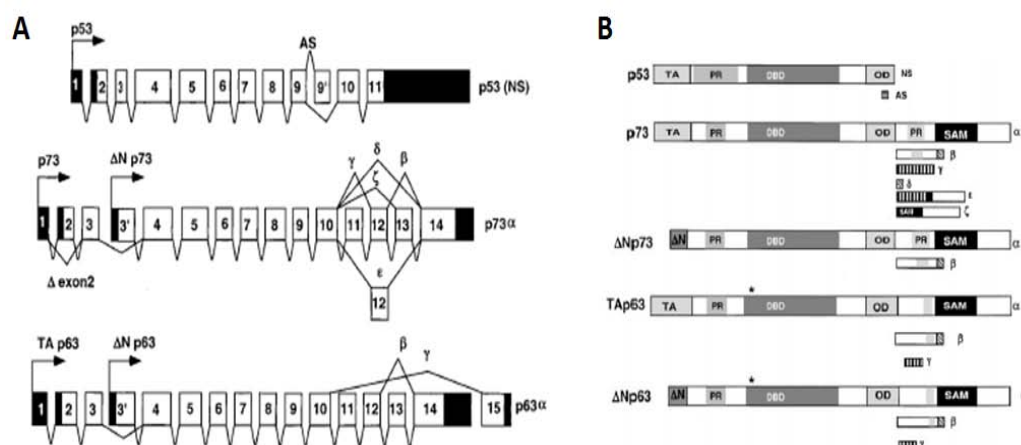


Figura 2: Architettura genica dei membri della famiglia di p53. A) p53 esiste nelle due varianti di splicing: p53 NS (normal splice) e p53 AS (alternative splice). L'isoforma AS è caratterizzata dalla sostituzione degli aminoacidi 364-390 con 17 residui esclusivi dell'isoforma stessa. Le frecce indicano i siti di inizio della trascrizione. Le regioni non trascritte sono indicate in nero. B) Le isoforme di p73 (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) e di p63 (α , β , γ) sono generate da eventi di splicing alternativo, che originano differenti estremità C-terminali. Le isoforme $\Delta Np73$ (α e β) e $\Delta Np63$ (α , β e γ), sono generate da un promotore alternativo posto all'interno dell'introne 3 e sono prive del dominio di transattivazione, possedendo una regione esclusiva all'estremità N-terminale (Irwin and Kaelin, 2001).

In generale, le isoforme di tipo TA sono in grado di legare il DNA attraverso le regioni responsive a p53 (REp53, Responsive Elements), espletando così le stesse funzioni esercitate dal fattore trascrizionale p53. Le isoforme ΔN , definite anche ΔTA , pur legandosi ai siti responsivi sui geni target non sono in grado di transattivarne l'espressione e agiscono quindi, come dominanti negativi inibendo gli altri membri della famiglia (TAp63, TAp73 e p53) (Zaika et al., 2002; Nakagawa et al., 2002; Moll and Slade, 2004). Esempificativi sono gli studi condotti durante l'embriogenesi sui neuroni, in cui l'isoforma $\Delta Np73$ è il prodotto predominante del gene TP73, e la sua presenza è richiesta per neutralizzare l'azione proapoptotica di p53 (Yang et al., 1998; 2000; Pozniak et al., 2000).

Un'ulteriore grado di complessità strutturale che caratterizza p73 e p63 è rappresentato da eventi di splicing alternativo che coinvolgono gli esoni 10-14 di TP73 e TP63 e che portano alla formazione di isoforme che differiscono nella regione carbossi-terminale, nove per p73 (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , η_1 , ϕ) (Kaghad et al., 1997; De Laurenzi et al., 1998; Melino et al., 2002; Moll and Slade 2004.) e tre per p63 (α , β , γ) (Yang et al., 1998).

In totale il gene TP73 esprime 35 varianti di RNA messaggero, che possono potenzialmente codificare per 29 isoforme proteiche; al momento ne sono state descritte

14 diverse (Murray-Zmijewski et al., 2006). Il gene TP63 può essere espresso in sei varianti che codificano per 6 differenti proteine (Figura 2B).

L'esistenza di diversi mRNA determina un pattern complesso di isoforme di p73 e p63 che corrisponde ad una varietà di funzioni sia comuni che ridondanti tra esse. Lo studio del fenotipo dei topi knock out per ciascun fattore trascrizionale ha permesso una maggiore comprensione della funzione dei membri della famiglia di p53.

In particolare verranno esaminate più in dettaglio le funzioni e le caratteristiche ascrivibili a p73.

1.3 Funzioni biologiche di p73

1.3.1 Ruolo di p73 nella regolazione della morte cellulare per apoptosi

Come già introdotto, *p73* è in grado di mimare l'attività trascrizionale e la funzione biologica di *p53* transattivando diversi promotori di geni responsivi a *p53* stesso. Tra i geni bersaglio indotti da entrambi i fattori trascrizionali ricordiamo: *p21*, *14-3-3 σ* , *GADD45*, *BTG2*, *PIG3* (Zhu et al., 1998; Jost et al., 1999; Lee et al., 1999; Ueda et al., 1999; De Laurenzi et al., 1998), *p53R2* (Nakano et al., 2000), *IGFBP3* (Steegenga et al., 1999). E' stato inoltre verificato che l'efficienza di attivazione dei geni bersaglio varia tra i diversi membri della famiglia di *p53*: *GADD45* è indotto maggiormente da *p73* rispetto a *p53*; viceversa *p53* esercita la sua funzione con più efficacia nei confronti di *p21* rispetto a *p73* (Zhu et al., 1998; Lee et al., 1999; Yu et al., 1999). Anche le diverse isoforme di *p73* mostrano una differente capacità di transattivare i promotori dei geni bersaglio: generalmente *p73 β* risulta molto più efficace nell'induzione dell'apoptosi rispetto all'isoforma *p73 α* (De Laurenzi et al., 1998; Lee et al., 1999). Questi risultati suggeriscono un ruolo inibitorio esercitato dalla regione della proteina contenente il dominio SAM, esclusivo delle isoforme di tipo α , ipotesi ulteriormente accreditata da studi condotti su mutanti di delezione di *p73 α* . In particolare, cellule esprimenti la proteina mutata mancante del dominio SAM mostrano un incremento dell'attività trascrizionale paragonabile a quella dell'isoforma *p73 β* (Ozaki et al., 1999).

Attraverso l'induzione dei geni bersaglio sopra elencati, *p73* controlla l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi. E' stato dimostrato che fibroblasti murini

embrionali (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) knock out per p73 mostrano difetti nella risposta apoptotica indotta da danno al DNA; successivamente è stato riscontrato lo stesso fenotipo in cervelli embrionali di topo *in vivo* provenienti da animali in cui p73 è deletato. La risposta apoptotica difettiva è ascrivibile alla perdita della proteina TAp73, che costituisce l'isoforma predominante in seguito al danno al DNA. In accordo con questa ipotesi sono i dati ottenuti reintroducendo l'isoforma TAp73 nei MEF knock out per p73. Solo in seguito a ciò risulta infatti ristabilita una corretta risposta apoptotica, in seguito a danno al DNA provocato da trattamenti con doxorubicina; viceversa, la reintroduzione dell'isoforma anti-apoptotica Δ Np73 non determina alcun effetto (Flores et al., 2002). Ulteriori studi sono stati condotti in topi con delezioni in eterozigosi di TP73. Brevemente, essi confermano l'ipotesi che l'inattivazione del gene di p73 determini una predisposizione allo sviluppo tumorale attraverso l'induzione di una morte apoptotica difettiva (Flores et al., 2005).

I membri della famiglia di p53 esercitano funzioni comuni anche attraverso una loro cooperazione. Attraverso saggi di immunoprecipitazione della cromatina (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) condotti in MEFs knock out per p73, è stata dimostrata un'assenza di legame tra p53 e i promotori di *Bax*, *Noxa* e *PERP*; mentre al contrario p73 risulta essere in grado di interagire con i suddetti promotori anche in cellule knock out per p53, come dimostrando che p73 è essenziale nell'induzione dell'apoptosi p53-mediata (Vousden et al., 2002).

Anche le isoforme Δ Np73 sono coinvolte nella regolazione della risposta apoptotica; queste proteine interferiscono con la trascrizione dei geni bersaglio di p53 e di p73 attraverso due differenti meccanismi: da un lato le isoforme Δ Np73 si legano agli elementi responsivi contenuti nei promotori dei geni che sono sotto il controllo di p53, impedendo così l'interazione del fattore di trascrizione stesso con le canoniche regioni di legame al DNA, mentre dall'altro lato, possono formare eterodimeri con p53 o con p73, sequestrandoli e impedendo così la loro interazione con i promotori dei loro geni bersaglio (Figura 3).

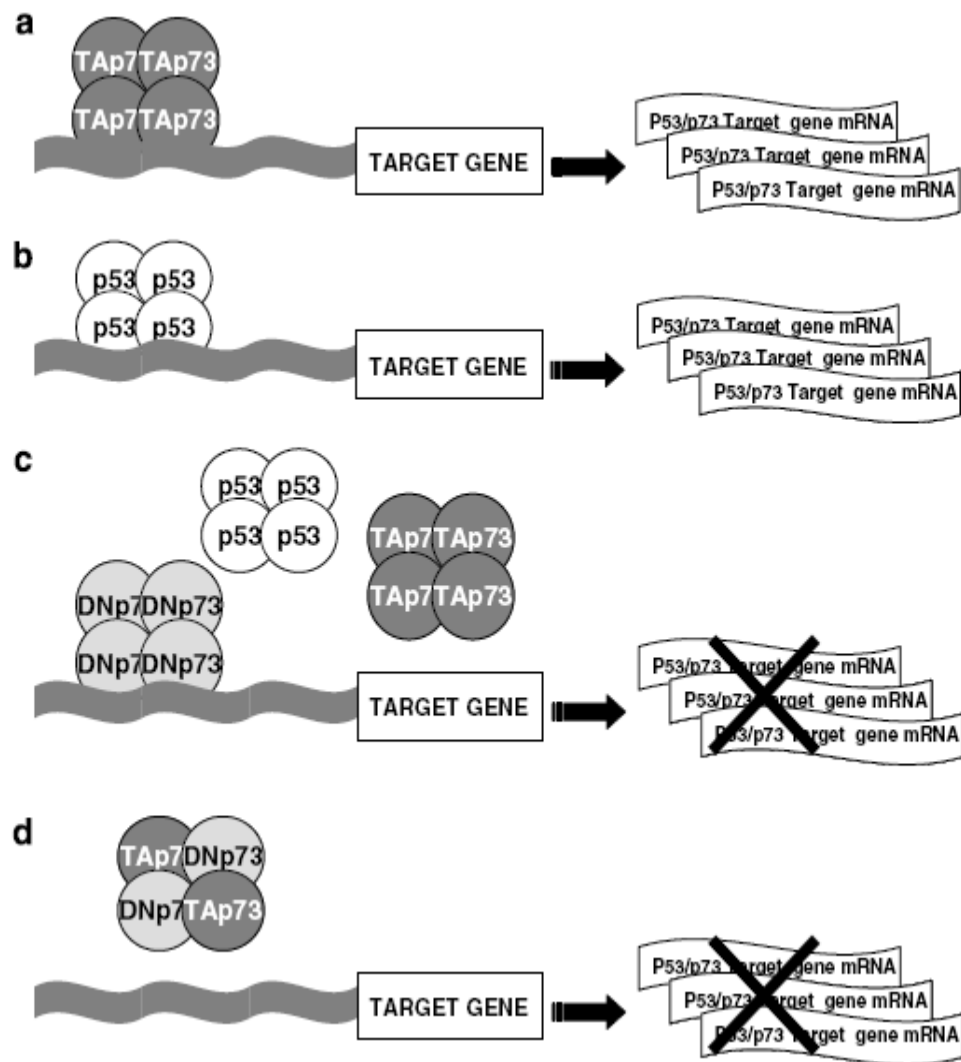


Figura 3: Meccanismo d'azione dell'isoforma $\Delta Np73$. L'isoforma $\Delta Np73$ è in grado di inibire l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi indotti sia da TAp73 (a), che da p53 (b). $\Delta Np73$ blocca l'attività trascrizionale di TAp73 e di p53 o competendo per lo stesso sito di legame posto sui promotori dei geni bersaglio di p53 (c), o sequestrando TAp73 in un complesso eterotetramero inattivo (d) (Marabese et al., 2007).

In cellule neuronali, è stata verificata un'attività anti-apoptotica della proteina $\Delta Np73\beta$. In particolare, $\Delta Np73\beta$ è l'isoforma predominante nel sistema nervoso in sviluppo e nei gangli simpatetici, ed, i suoi livelli di espressione risultano elevati in presenza del fattore di crescita nervoso (Neural Growth Factor, NGF) e diminuiscono in sua assenza. Nelle condizioni di privazione di NGF, le cellule neuronali vanno incontro a meccanismi apoptotici dipendenti da p53 (Miller et al., 2000). I bassi livelli d'espressione di $\Delta Np73$ in seguito a privazione di NGF, sono quindi responsabili dell'induzione apoptotica e dell'incremento dell'attività di trascrizionale di p53. Ad ulteriore conferma del ruolo anti-apoptotico svolto dall'isoforma $\Delta Np73$, sono state

esaminate cellule neuronali knock out per p73; in questo sistema cellulare, la deprivazione di NGF o l'overespressione di p53 determinano un aumento della risposta apoptotica rispetto alle cellule wild-type, mentre la reintroduzione dell'isoforma Δ Np73 nei neuroni previene la morte cellulare (Pozniak et al., 2000).

1.3.2. Ruolo di p73 nello sviluppo embrionale e nel differenziamento

Come già introdotto, lo studio di topi knock out per p73, ottenuti attraverso una eliminazione funzionale di tutte le sue isoforme, ha dimostrato come questa proteina sia fondamentale per il corretto sviluppo neuronale e come la sua espressione sia molto accentuata nel sistema nervoso in via di sviluppo, ed in particolare, nei gangli cervicali simpatici superiori; l'isoforma Δ Np73 è predominante nel sistema neuronale fetale. Studi di ibridazione *in situ* ne hanno infatti dimostrato un'elevata espressione nel plesso corioideo, nell'area vomeronasale e nell'area preottica. (Yang et al., 2000; Pozniak et al., 2000).

La delezione del gene TP73 determina diversi difetti neuronali tra cui: la disgenesi dell'ippocampo dovuta alla perdita di neuroni bipolari chiamati Cajal-Retzius sia nella zona marginale della corteccia che negli strati molecolari, l'idrocefalia dovuta ad ipersecrezione del fluido cerebrospinale e ad una risposta iperinflammatoria della mucosa respiratoria, e lo sviluppo di comportamenti sociali e riproduttivi anomali causati da difetti nella percezione dei ferormoni (Yang et al., 2000; Pozniak et al., 2000).

L'espressione di p73 risulta molto accentuata nel sistema nervoso in via di sviluppo, ed in particolare, nei gangli cervicali simpatici superiori. L'isoforma Δ Np73 è predominante nel sistema neuronale fetale. Studi di ibridazione *in situ* ne hanno infatti dimostrato un'elevata espressione nel plesso corioideo, nell'area vomeronasale e nell'area preottica. (Yang et al., 2000).

Questi studi funzionali condotti *in vivo* hanno rivelato una funzione anti-apoptotica dell'isoforma Δ Np73, che è infatti richiesta per contrastare la morte neuronale durante le prime fasi dello sviluppo del sistema nervoso (Pozniak et al., 2000). Il meccanismo attraverso il quale Δ Np73 promuove la sopravvivenza cellulare è determinato da una combinazione di eventi che comprendono l'inattivazione dei membri trascrizionalmente attivi della famiglia di p53 (p53, TAp63 e TAp73) da un lato (Moll and Slade, 2004) e l'induzione della cascata di segnali nel mitocondrio dall'altro (Irwin

and Miller., 2004). I segnali apoptotici aventi luogo nel mitocondrio vengono indotti in seguito ad un aumento dell'espressione del gene *Bax* ed una sua rilocalizzazione dal citosol al mitocondrio, mediata dall'azione di *Puma*, con successivo rilascio del citocromo c. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'isoforma $\Delta Np73$ svolge un ruolo nella risposta apoptotica nel mitocondrio. L'interazione tra le due isoforme di p73 ($\Delta Np73$ e TAp73) risulta infatti responsabile dell'inibizione dell'attività trascrizionale di TAp73, che si riflette con la riduzione della transattivazione di entrambi i geni *Bax* e *Puma* e una conseguente riduzione della risposta apoptotica (Melino et al., 2004).

In diverse linee cellulari, p73 svolge un ruolo fondamentale anche durante il processo di differenziamento. L'induzione del fattore di trascrizione è stata verificata in linee di neuroblastoma durante il differenziamento indotto da retinoidi (De Laurenzi et al., 2000; Kovalev et al., 1998). Inoltre un aumento dell'espressione p73 α e p73 β è stato associato con i processi di differenziamento delle cellule mieloidi, mentre l'induzione della trascrizione delle isoforme p73 γ e p73 δ è stata osservata durante il differenziamento dei cheratinociti epidermici (Tschan et al., 2000; De Laurenzi et al., 2000).

Recentemente è stato attribuito un ruolo nel processo di differenziamento anche all'isoforma $\Delta Np73$. L'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p57^{kip2} è un noto gene bersaglio di p73 (Blint et al., 2002). In cellule di rabdomiosarcoma, dove l'isoforma $\Delta Np73$ risulta essere overespressa, l'espressione della chinasi p57^{kip2} invece risulta diminuire, evento che determina l'inattivazione del fattore pRb e il conseguente blocco dell'uscita dal ciclo cellulare oltre all'interruzione del differenziamento dei mioblasti murini. La riduzione dell'espressione della chinasi p57^{kip2} è ascrivibile all'azione inibitoria di $\Delta Np73$, che risulta in grado di interagire fisicamente con l'isoforma TAp73, e di costituire un legame diretto con il promotore del gene codificante per la chinasi p57^{kip2} (Cam et al., 2006).

1.3.3 Ruolo di p73 nella tumorigenesi

Il gene TP73 mappa nella regione cromosomica 1p36.33, che risulta frequentemente deleta in una varietà di tumori umani inclusi neuroblastoma, melanoma, carcinoma alla mammella e il tumore del colon (Irwin and Kaelin, 2001). La posizione

cromosomiale di TP73 e le somiglianze strutturali e funzionali con il fattore p53 hanno fatto ipotizzare che p73 possa agire come un gene oncosoppressore (Kaghad et al., 1997). Tuttavia, studi genetici condotti su differenti tessuti tumorali hanno però escluso che p73 sia un classico oncosoppressore di tipo Knudson, che per definizione risulta perdere la sua funzione o la sua espressione durante il processo di tumorigenesi. Infatti p73, a differenza dell'omologo strutturale p53, risulta raramente mutato nei tumori umani (Zaika et al., 1999; Tsao et al., 1999; Nomoto et al., 1998).

Studi recenti condotti su topi eterozigoti per l'espressione di p73 hanno messo in luce un ruolo del fattore di trascrizione nella tumorigenesi: topi adulti $p73^{+/-}$ mostrano infatti una propensione a sviluppare lesioni premaligne e tumori spontanei; inoltre proprio in alcuni di questi tumori è stata anche verificata la perdita del secondo allele di p73, suggerendo la possibilità che alcune isoforme di p73 possano agire come oncosoppressori. Ad ulteriore conferma dell'ipotesi di un ruolo di p73 durante il processo di tumorigenesi, sono stati condotti studi su topi doppio eterozigoti sia per il gene p73 che per il gene p53 ($p73^{+/-}$; $p53^{+/-}$); in questo sistema è stata monitorata una più elevata incidenza di lesioni metastatiche rispetto a topi eterozigoti per il solo gene p53 ($p73^{+/+}$; $p53^{+/-}$) (Flores et al., 2005).

Studi iniziali condotti su differenti tipi di tumori umani inclusi neuroblastoma, glioma, carcinoma della mammella, del polmone, del colon, dello stomaco, del fegato, e della vescica hanno dimostrato un'aumentata espressione di p73, piuttosto che una sua mutazione o delezione genica (Moll and Slade, 2004); in questi studi però non sono state prese in considerazione eventuali differenze nell'espressione delle varie isoforme di p73. Recentemente invece sono stati condotti studi mirati a discriminare tra le due isoforme di p73, TA e ΔN . I risultati ottenuti mostrano che l'isoforma $\Delta Np73$ risulta essere debolmente espressa o addirittura assente nei tessuti normali, mentre dall'esame di tumori di diversa origine istologica è stata verificata una sua aumentata espressione, in particolare nel carcinoma della mammella, delle ovaie, negli epatociti e nei tumori neuroblastici (Zaika et al., 2002; Concin et al., 2004; Dominguez et al., 2006; Douc-Rasy et al., 2002; Guan and Chen, 2005). Oltre ad un'alterata espressione dell'isoforma $\Delta Np73$, è stato monitorato un incremento dell'espressione anche delle altre varianti mancanti della regione N-terminale: le isoforme $\Delta NExp73$ e $\Delta NEx2/3p73$ (Stiewe et al., 2002; Putzer et al., 2003).

Altri dati ottenuti dall'esame di tessuti tumorali umani hanno messo in evidenza come un'aumentata espressione delle isoforme TAp73 correli con elevati livelli di

espressione proteica dell'isoforma $\Delta Np73$, processo dovuto alla capacità di TAp73 di legare e transattivare il promotore di $\Delta Np73$ (Grob et al., 2001; Slade et al., 2004; Dominguez et al., 2006). In uno studio condotto su cellule di carcinoma della cervice è stata verificata un'induzione di entrambe le isoforme TA e $\Delta Np73$, ma attraverso un meccanismo mutualmente esclusivo. L'aumento dell'espressione dell'isoforma $\Delta Np73$ è stato osservato nel 41% dei casi esaminati e correlato con la resistenza alle radiazioni e con un incremento del danno, viceversa elevati livelli dell'isoforma TAp73 sono stati osservati nel 31% dei casi e sono stati associati ad una maggiore sensibilità alle radiazioni (Liu et al., 2006).

Recentemente è stata monitorata un'aumentata espressione dell'isoforma TAp73 sia in linee cellulari sia in carcinomi primari, paragonata a cellule normali dell'epitelio basale. In queste stesse cellule è stata verificata anche un'induzione dell'isoforma $\Delta Np63$, fisicamente associata all'isoforma TAp73. L'interazione tra le due proteine, ha permesso di predire un'inibizione del fattore TAp73, con conseguente riduzione dell'apoptosi p73-dipendente (Deyoung et al., 2006; Rocco et al., 2006).

Altro dato interessante viene dall'osservazione condotta su leucemie linfoblastiche e su linfomi di Burkitt, in cui è stata verificata la presenza di metilazione sul promotore P1 di p73 responsabile del silenziamento delle isoforme TA (Corn et al., 1999; Kawano et al., 1999). In diversi tumori quali leucemie, carcinoma della vescica, della mammella, e a cellule squamose, è stata anche determinata la perdita o la ridotta espressione dell'isoforma TAp73 (Moll and Slade, 2004).

Il quadro che può essere ottenuto da tutti questi dati presi nel loro insieme ha portato alla formulazione di diverse ipotesi sul ruolo di p73 nella carcinogenesi, la maggiormente accreditata delle quali postula che in seguito all'aumentata espressione dell'isoforma $\Delta Np73$ o alla presenza di livelli ridotti delle varianti TA, $\Delta Np73$ compete con p53 e TAp73 per il legame ai promotori dei geni bersaglio, provocando infine una diminuita risposta apoptotica, con conseguente progressione tumorale (Stiewe et al., 2002; Zaika et al., 2002; Concin et al., 2005). La capacità di $\Delta Np73$ di promuovere la sopravvivenza cellulare ha portato ad attribuire a questa isoforma un ruolo oncogenetico opposto a quello di soppressore tumorale esercitato dalle varianti TA. Il ruolo di oncogene di $\Delta Np73$ è stato confermato dalla sua capacità di determinare immortalizzazione di cellule primarie attraverso la sua cooperazione con Ras e di promuovere la crescita tumorale nei topi nudi (Petrenko et al., 2003).

Tutte queste osservazioni hanno permesso di formulare l'ipotesi che in molti tipi di tumori sia proprio il rapporto relativo delle due isoforme di p73 a determinare lo sviluppo e/o la progressione del tumorale.

La situazione risulta ulteriormente complicata dall'esistenza di mutanti di p53, generati da polimorfismi nella posizione aminoacidica 72 (Arg/Pro), che sono in grado di legare ed inattivare l'isoforma TAp73 (Marin et al., 2000; Gaiddon et al., 2001; Di Como et al., 1999; Strano et al., 2000).

Riassumendo, attraverso l'analisi dei livelli di espressione di p73 nei tumori umani, si è rafforzata l'idea che durante la tumorigenesi le funzioni di oncosoppressore del TAp73 tendano ad essere neutralizzate sia da una relativa elevata espressione dell'isoforma Δ Np73, che dei mutanti di p53 (Oswald and Stiewe, 2008).

1.3.4. Ruolo di p73 nella chemio sensibilità

Nelle cellule di mammifero i livelli di espressione della proteina p53 vengono mantenuti bassi in modo da assicurare una corretta progressione del ciclo cellulare e per preservare la cellula da un'eventuale induzione di morte non controllata. Stimoli di stress cellulare sono invece responsabili dell'induzione di p53. Analogamente a p53, anche p73 è sottoposto ad una rigida regolazione: in condizione basali i suoi livelli proteici vengono mantenuti ridotti, mentre in risposta ad radiazioni γ o in seguito a trattamento con agenti chemioterapici, quali cisplatino, etoposide, adriamicina, taxolo, doxorubicina, i suoi livelli proteici endogeni aumentano (Agami et al., 1999; Costanzo et al., 2002; Gong et al., 1999; Irwin et al., 2003; Bergamaschi et al., 2003).

L'accumulo della proteina p73 è dovuto sia ad una induzione trascrizionale (Irwin et al., 2000; Seelan et al., 2002), sia principalmente, ad una stabilizzazione della proteina stessa che determina l'induzione di geni bersaglio coinvolti nella risposta apoptotica. Viceversa, il blocco della funzionalità di p73, attraverso interferenza dell'RNA (RNA interference), determina un incremento della chemioresistenza, che risulta essere indipendente dallo stato di p53. L'importanza di p73 in risposta ad agenti chemioterapici è stata messa in luce in maniera ancora più significativa da Irwin et al. (1999); infatti questi autori hanno verificato come la presenza di p73 sia essenziale per l'induzione apoptotica p53-dipendente in MEFs, ma sia, al contrario, in grado di indurre

apoptosi anche in cellule in cui p53 non è espresso o non è funzionale (Irwin et al., 1999; Flores et al., 2002).

In colture cellulari, è stato verificato che l'isoforma $\Delta Np73$, può inibire la risposta apoptotica p53-dipendente innescata da agenti chemioterapici (Zaika et al., 2002; Vossio et al., 2002), così come mutanti di p53, dovuti ad un polimorfismo nel residuo di Arg72, possono bloccare la funzionalità di p73 e la conseguente risposta apoptotica dipendente dall'azione di chemioterapici (Di Como et al., 1999; Gaiddon et al., 2001; Blandino et al., 1999).

1.4 Regolazione di p73

1.4.1 Regolazione trascrizionale di p73

L'espressione del gene codificante per le diverse varianti di p73 è regolata trascrizionalmente attraverso vie distinte. Gli studi condotti inizialmente sulla regolazione dell'espressione genica di TP73 hanno identificato il promotore P1, localizzato nella regione non tradotta all'estremità 5', a monte dell'esone 1, come la regione responsabile della trascrizione delle isoforme di tipo TA. Più recentemente è stata dimostrata l'esistenza di un secondo promotore interno (P2) posto nell'introne 3, responsabile invece della trascrizione delle isoforme ΔN . L'esame dei due promotori ha stabilito l'esistenza di distinti RE a fattori di trascrizione, suggerendo quindi una differente regolazione delle isoforme di TA e ΔN di p73. In particolare, l'attivazione dei fattori trascrizionali E2F-1 e c-myc e della proteina virale E1A, determinata da stress oncogenici, è importante per la regolazione delle isoforme TAp73 (Zaika et al., 2001; Stiewe and Putzer, 2000; Lissy et al., 2000; Irwin et al., 2000; Melino et al., 2002), mentre il promotore P2 è principalmente regolato dai membri della famiglia di p53, attraverso un meccanismo di feedback (Grob et al., 2001; Nakagawa et al., 2002).

E2F1 funziona da attivatore trascrizionale specifico per TAp73, interagendo con il proprio RE situato nel promotore P1 (Irwin et al., 2000; Seelan et al., 2002). In alcuni tumori umani è stata osservata un'aumentata espressione dell'oncogene E2F1, che si riflette in un'induzione trascrizionale di TP73. Questo processo accredita ulteriormente l'idea di un ruolo di TAp73 nella tumorigenesi, come già descritto precedentemente (Stiewe et al., 2000; Irwin et al., 2000). Studi condotti su MEFs knock out per p53 o p73

hanno dimostrato che l'induzione di p73, determinata dall'attivazione di E2F1, è responsabile dell'incremento di morte cellulare sia attraverso un meccanismo d'azione sinergico con p53, sia in maniera indipendente da p53 (Irwin et al., 2000).

E2F1 risulta essere importante anche nella risposta al danno al DNA; in cellule mutate per p53, in seguito a danno genotossico, le chinasi Chk1 e Chk2 vengono attivate e determinano la stabilizzazione e l'attivazione di E2F-1, responsabile a sua volta dell'induzione trascrizionale di p73 (Urist et al., 2004).

Studi recenti hanno inoltre dimostrato che l'espressione del fattore virale E1A induce la trascrizione dell'mRNA di TAp73, attraverso l'interazione con il sito di legame per E2F-1 situato sul promotore P1 di TPp73 (Flinterman et al., 2005).

Il fattore c-myc risulta essere invece responsabile di un'inibizione della trascrizione di p73 (Watanabe et al., 2002).

L'espressione genica di TAp73 è inoltre regolata da eventi di metilazione del DNA. All'interno del primo introne di TP73 è posizionato il sito di legame del repressore trascrizionale ZEB; la metilazione di questa regione determina la perdita di interazione tra ZEB ed il promotore di p73, con conseguente induzione della sua trascrizione. Questo meccanismo è tessuto-specifico ed avviene durante eventi di differenziamento in cellule neuronali ed in miociti (Fontemaggi et al., 2001).

Eventi di ipermetilazione sono stati riscontrati nel linfoma di Burkitt e nella leucemia linfoblastica, in cui determinano il silenziamento del gene di p73; questo dato rafforza il ruolo di oncosoppressore attribuito a p73. (Corn et al., 1999; Kawano et al., 1999). La trascrizione delle isoforme di p73 risulta essere controllata anche da meccanismi di feedback tra i vari membri della famiglia di p53. Il promotore P2 viene regolato positivamente sia da p53 che da TAp73, meccanismo questo responsabile dell'induzione dell'espressione delle isoforme Δ Np73 (Grob et al., 2001; Nakagawa et al., 2002).

1.4.2 Regolazione post-traduzionale di p73

Dalle funzioni biologiche esaminate fin'ora e dalle implicazioni nei processi di tumorigenesi, risulta di grande interesse comprendere in maniera approfondita quali siano le modificazioni post-traduzionali di p73 e quali gli interattori molecolari che contribuiscono alla sua regolazione.

Il meccanismo fondamentale responsabile della regolazione della stabilità di p73 risulta essere l'ubiquitinazione. Diversi studi hanno dimostrato che la stabilità proteica di p73 è regolata da meccanismi ubiquitina-proteasoma dipendenti. I livelli proteici di p73 vengono stabilizzati in seguito al trattamento con inibitori specifici del proteosoma, come l'MG132 e la lactacistina (Balint et al., 1999). La co-espressione di ubiquitina e di p73 determina un accumulo della forma ubiquitinata di p73 (Bernassola et al., 2004). Infine, studi condotti su cellule ts20, contenenti un enzima E1 di attivazione dell'ubiquitina termolabile (Ohh et al., 2002), mostrano come p73 venga stabilizzato in seguito ad inattivazione dei meccanismi di ubiquitinazione (Bernassola et al., 2004).

L'ubiquitinazione ed il suo contributo alla regolazione di p73 verranno esaminati in dettaglio più avanti, mentre qui di seguito verranno illustrati gli eventi di fosforilazione, acetilazione e sumoilazione che interessano p73.

Fosforilazione

p73 sottostà ad eventi di fosforilazione che comportano un'incremento della sua attivazione trascrizionale e della sua stabilizzazione. Numerosi studi hanno messo in evidenza come il danno al DNA, causato da irradiazione con raggi γ , sia responsabile della fosforilazione del residuo di Tyr⁹⁹ ad opera della chinasi c-abl, e della successiva induzione dell'apoptosi p73-dipendente (Yuan et al., 1999; Agami et al., 1999) (Figura 4). Il meccanismo d'azione prevede la formazione di un complesso tra la regione ricca in proline (PXXP) di p73 ed il dominio SH3 posizionato su c-abl. La successiva fosforilazione attiva la proteina ma non risulta stabilizzarla.

Alcuni agenti chemioterapici, come il cisplatino, sono responsabili sia dell'attivazione funzionale di p73, sia della sua stabilizzazione; anche in questo caso la fosforilazione risulta dipendente dall'azione della chinasi c-abl, ma il residuo modificato post-traduzionalmente non è una tirosina (Gong et al., 1999).

Studi condotti da Gonzalez et al., 2003 hanno dimostrato che p73 viene fosforilato anche nel residuo Ser⁴⁷ dalla chinasi CHK1, che viene attivata in risposta al danno al DNA; ne consegue l'induzione di apoptosi dipendente da p73 (Gonzalez et al., 2003) (Figura 4).

La fosforilazione di p73 può alternativamente inibire la funzionalità di p73, il quale può interagire fisicamente *in vitro* con diverse cicline e complessi ciclina-CDKs (Cyclin-dependent kinases, CDKs), come ad esempio il complesso ciclina A-CDK1/2,

ciclina B-CDK1/2, e ciclina E-CDK2. Questa interazione determina la fosforilazione di p73 nel residuo Thr⁸⁶, che inibisce l'induzione di p21 da parte di p73 (Gaiddon et al., 2003) (Figura 4). Studi *in vivo* hanno dimostrato un'associazione tra p73 e la chinasi mitotica ciclina B-CDK1; l'interazione è responsabile di una ridotta capacità di p73 di legarsi al DNA e di attivare la trascrizione. Inoltre è stata osservata un'iperfosforilazione delle isoforme p73 α e p73 β in cellule in mitosi (Fulco et al., 2003).

Acetilazione

p73 viene acetilato dall'acetiltrasferasi p300/CBP (cAMP-responsive element binding protein). L'enzima opera modificando post-traduzionalmente i residui Lys³²¹, Lys³²⁷ e Lys³³¹ di p73 (Figura 4). Costanzo et al., (2002) hanno dimostrato che il danno al DNA induce eventi di acetilazione. In particolare, la forma non acetilata di p73 è meno efficace nell'induzione dei geni pro-apoptotici come p53^{AIP1}. Questi dati indicano che l'acetilazione di p73 indotta dal danno al DNA, contribuisce ad aumentare la capacità di p73 di trasattivare i geni apoptotici che sono sotto il suo controllo (Costanzo et al., 2002).

Mantovani et al., 2004 hanno dimostrato che l'acetilazione di p73, mediata da p300, viene promossa dall'associazione tra prolil-isomerasi Pin1 e p73. Inoltre l'azione coordinata tra Pin1 e p300 è responsabile, in ultima analisi, di un incremento della stabilità e dell'attività trascrizionale di p73 (Mantovani et al., 2004)

Sumoilazione

In generale, il legame di uno dei tre paraloghi della famiglia di SUMO (SUMO1, 2 e 3) alle proteine svolge diverse funzioni biologiche, come la regolazione della stabilità proteica, dell'attività di fattori trascrizionali e del ciclo cellulare. Entrambe le isoforme di p73 (TA e Δ N) sono regolate dal legame covalente di SUMO1 al residuo di lisina 627 (Figura 4). Tale legame è catalizzato dall'enzima PIAS1, una E3 SUMO ligasi, e promuove la degradazione di p73, un cambiamento della sua localizzazione subcellulare ed una repressione della sua attività trascrizionale (Minty et al., 2000, Munarriz et al., 2004). In particolare Munarriz et al., (2004), hanno verificato come la sumoilazione di p73 dipendente da PIAS1 avvenga esclusivamente nella matrice

nucleare e risulta responsabile dell'inibizione di p73. P1AS1 è espresso prevalentemente durante la fase S del ciclo cellulare, in cui contribuisce alla riduzione della trascrizione di p21 mediata da p73, con conseguente diminuzione del numero di cellule nella fase G1/S (Munarriz et al., 2004).

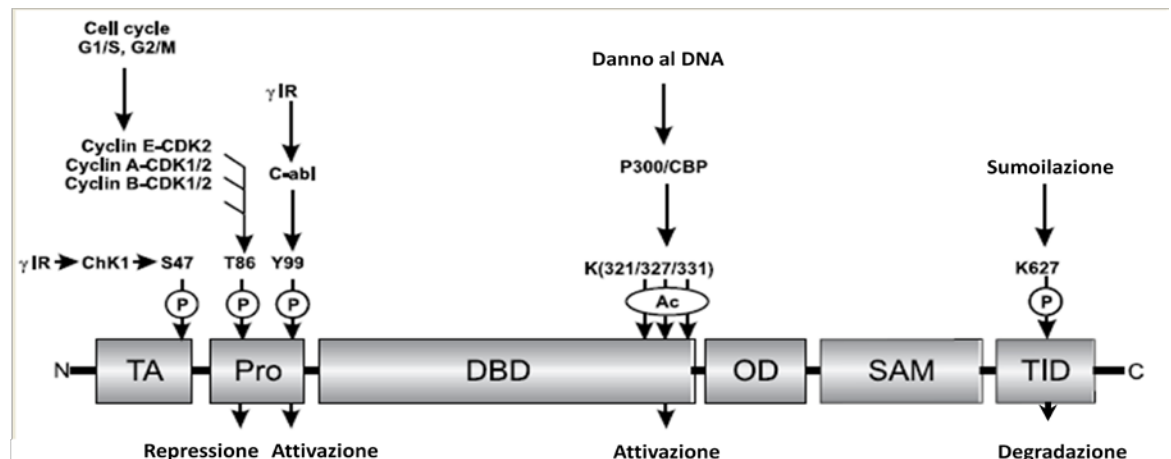


Figura 4: Modificazioni post-traduzionali della proteina p73. La fosforilazione dei residui S47 e Y99, causata da irradiazione γ , determina un'attivazione di p73. Alcuni complessi ciclina-CDK fosforilano il residuo T86 di p73, provocando un'inibizione dell'attività trascrizionale di p73 con conseguente progressione del ciclo cellulare. In seguito a danni al DNA l'enzima p300/CBP acetila p73 nei residui 321, 327 e 331, determinando un incremento dell'attività trascrizionale di p73. La reazione di sumoilazione del residuo K627 stabilizza p73 e inibisce l'attivazione di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare (Moll and Slade, 2004).

1.5 La reazione di ubiquitinazione

1.5.1 Generalità della cascata enzimatica dell'ubiquitinazione

La replicazione ed il riparo del DNA, la mitosi, la trascrizione, il differenziamento e la morte cellulare, la risposta immunitaria, l'endocitosi e la trasduzione del segnale sono funzioni cellulari fondamentali, finemente regolate da differenti meccanismi molecolari. La reazione di ubiquitinazione è uno dei più importanti meccanismi preposti alla regolazione dei suddetti processi (Cardozo and Pagano, 2004).

L'ubiquitinazione è una modificazione post-traduzionale che prevede la formazione di un legame covalente tra l'ubiquitina ed una proteina bersaglio. L'ubiquitina è una proteina globulare costituita da 76 aminoacidi, altamente conservata

tra tutti gli organismi eucarioti. Attraverso la reazione di ubiquitinazione l'ubiquitina viene coniugata alle proteine accettrici tramite la formazione di un legame isopeptidico tra l'estremità C-terminale dell'ubiquitina (residuo di glicina76) e l'aminogruppo del residuo di lisina del polipeptide coinvolto nella reazione (Pickart, 2001).

L'ubiquitinazione è un processo enzimatico complesso, che prevede l'azione sequenziale di tre differenti enzimi: l'enzima di attivazione dell'ubiquitina (E1), l'enzima di coniugazione dell'ubiquitina (E2) e l'enzima responsabile del legame dell'ubiquitina (ubiquitina ligasi, E3). L'E1 è responsabile dell'attivazione del residuo di glicina contenuto all'estremità C-terminale dell'ubiquitina, attraverso un meccanismo ATP-dipendente. Questo processo consiste nella formazione di un legame tioestere tra l'ubiquitina ed un residuo di cisteina, situato nel sito catalitico dell'enzima E1, con il concomitante rilascio di PP_i e AMP. L'ubiquitina attivata in questa prima fase viene successivamente trasferita al residuo catalitico (una cisteina) dell'E2 mediante la formazione di un ulteriore legame tioestere. Infine l'ultima fase del processo è catalizzata dall'enzima E3, e prevede la formazione del legame isopeptidico tra l'estremità C-terminale dell'ubiquitina, precedentemente attivata, e l' ϵ -aminogruppo del residuo di lisina della proteina accettrice (Hershko and Ciechanover 1998) (Figura 5). Come si vedrà in seguito, le E3 possono sia possedere un'attività enzimatica intrinseca sia semplicemente coadiuvare il trasferimento dell'ubiquitina dall'E2 al substrato proteico.

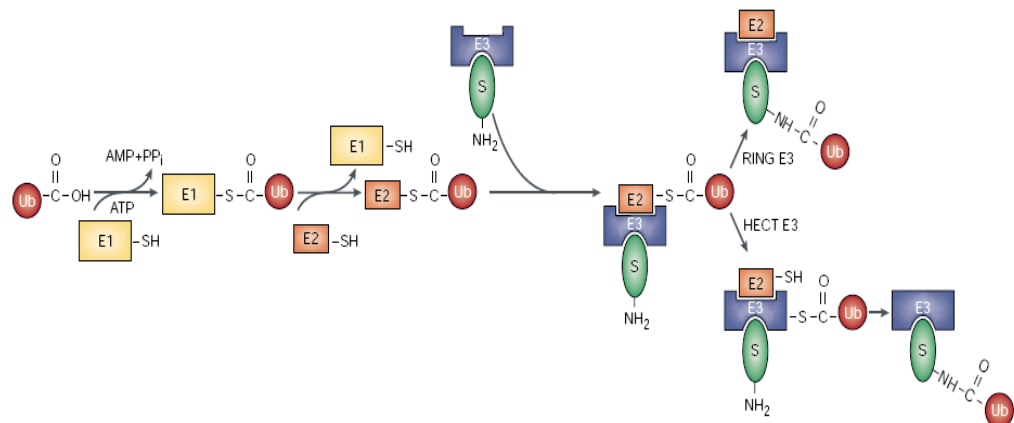


Figura 5: La reazione di ubiquitinazione. L'ubiquitina libera è attivata mediante un meccanismo dipendente dall'ATP che comporta la formazione di un legame tioestere tra l'enzima E1 e l'estremità carbossi-terminale dell'ubiquitina. La seconda fase comporta il trasferimento dell'ubiquitina all'E2. L'E2 interagisce con l'E3 facilitando il trasferimento finale dell'ubiquitina al substrato. Le HECT ligasi ricevono l'ubiquitina attivata e la legano attraverso il dominio HECT, successivamente la trasferiscono al substrato. Le E3 RING, invece trasferiscono direttamente l'ubiquitina al substrato. (Weissman, 2001)

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

1.5.2 Differenti tipi di ubiquitinazione e loro significato biologico

Poiché le catene di ubiquitina possono essere formate utilizzando diversi residui di lisina presenti nell'ubiquitina stessa, e grazie alla sua elevata specificità di legame alle proteine bersaglio, l'ubiquitinazione delle proteine costituisce un segnale multifunzionale e come tale influenza diversi processi biologici. Il modo attraverso il quale l'ubiquitina viene legata ai substrati proteici, determina il destino delle proteine bersaglio. Una proteina può infatti venire modificata su di un singolo o su diversi residui di lisina (Wilkinson, 2001). Quando un'unica molecola di ubiquitina viene coniugata ad un solo residuo di lisina, ci si riferisce ad una reazione di monoubiquitinazione, viceversa, quando più residui di lisina del substrato sono coinvolti nel legame all'ubiquitina si parla di multiubiquitinazione. Infine, più molecole di ubiquitina possono essere legate ad un residuo di lisina del substrato per formare una catena di poliubiquitina (poliubiquitinazione) (Figura 6A).

Sia la monoubiquitinazione che la multiubiquitinazione costituiscono un segnale per il controllo di diversi processi cellulari inclusi la trascrizione, la funzionalità degli istoni, l'endocitosi, il traffico di proteine di membrana e la localizzazione subcellulare (Hicke and Dunn., 2003; Muratani and Tansey.,2003; Hicke, 2001; Katzmann et al., 2002) (Figura 6B).

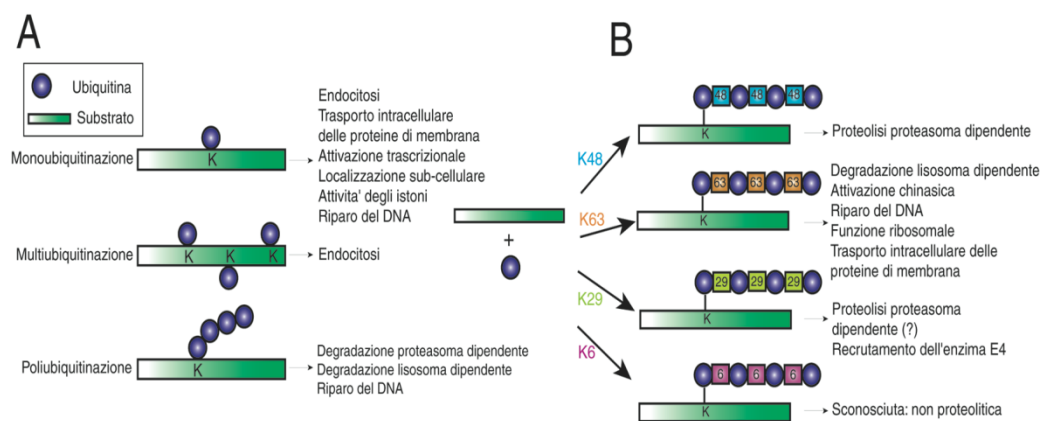


Figura 6: Meccanismi di modificazione delle proteine da parte dell'ubiquitina. I substrati possono essere modificati attraverso il legame di una singola molecola di ubiquitina con un singolo residuo di lisina (monoubiquitinazione), oppure mediante l'interazione di più molecole singole di ubiquitina su residui di lisina multipli (multiubiquitinazione), o infine tramite la formazione di catene costituite da più molecole di ubiquitina su di un singolo residuo di lisina (poliubiquitinazione). La monoubiquitinazione regola diversi processi cellulari quali l'endocitosi, il trasporto intracellulare, l'attivazione trascrizionale, il riparo al DNA e l'attività degli istoni. La multiubiquitinazione è ancora poco caratterizzata e risulta svolgere funzioni nei processi di endocitosi. La poliubiquitinazione può avvenire su diversi residui di lisina presenti nell'ubiquitina e di conseguenza servire per diversi processi biologici. Catene generate utilizzando la Lys 48 costituiscono il segnale per la degradazione proteosoma-dipendente. Catene formate attraverso residui di Lys 63 sono implicate nella regolazione del riparo al DNA, nell'attivazione chinasi, nella funzione ribosomiale e nel trasporto delle proteine di membrana. Catene originate dall'utilizzo della Lys29 sono coinvolte nel reclutamento dell'enzima E4. Le catene generate attraverso l'utilizzo degli altri residui (lys6, lys11, lys27 e lys33) sono ancora poco caratterizzate.

Ad esempio, i recettori dei fattori di crescita, una volta attivati, vengono generalmente rimossi dalla superficie cellulare e trasportati nei compartimenti endosomiali; successivamente, possono essere degradati o alternativamente possono tornare sulla membrana cellulare ed essere nuovamente impiegati per un altro ciclo. Il processo descritto viene finemente regolato da meccanismi di ubiquitinazione. Diverse permeasi e trasportatori in *S. cerevisiae* così come recettori delle tirosin chinasi (receptor tyrosin kinases, RTKs) in cellule animali, sono soggetti a mono o a multiubiquitinazione (Haglund et al., 2003; Terrell et al., 1998; Galan et al., 1997).

Un altro processo cellulare coordinato da eventi di ubiquitinazione è il riparo del DNA. In particolare, recentemente sono stati condotti diversi studi sul meccanismo di sintesi del DNA lesionato coordinato dal fattore replicativo PCNA (proliferating cell nuclear antigen), in grado di reclutare la DNA polimerasi. La diversa ubiquitinazione a cui può sottostare PCNA, è responsabile del reclutamento di polimerasi distinte; infatti PCNA monoubiquitinato interagisce con la polimerasi replicativa, viceversa, in seguito a poliubiquitinazione costituita da una catena le cui ubiquitine si legano attraverso la lys63

è la polimerasi di translesione ad essere coinvolta (Bienko et al., 2005; Kannouche and Wing, 2004).

L'ubiquitinazione è un processo fondamentale anche nella regolazione della trascrizione: gli istoni infatti sono stati il primo substrato scoperto in grado di interagire con la molecola di ubiquitina, ad oggi molti lavori hanno determinato come l'ubiquitinazione degli istoni possa essere responsabile di ulteriori modificazioni post-traduzionali negli istoni stessi (metilazione, acetilazione), in grado di alterare la struttura della cromatina (Muratani and Tansey, 2003). Alcuni esempi verranno illustrati in seguito.

L'ubiquitina contiene sette residui di lisina conservati (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 e Lys63), in grado di generare catene di poliubiquitina interagendo con il residuo di glicina posto all'estremità carbossi-terminale di una molecola di ubiquitina adiacente (Hershko and Ciechanover, 1998; Ciechanover, 1994, 2005; Hershko, 2005).

Generalmente l'utilizzo del residuo Lys48 è finalizzato alla formazione di catene di ubiquitina che costituiscono il segnale di riconoscimento per il proteosoma. Tuttavia, alcuni studi dimostrano che anche i residui Lys11 e Lys29, potrebbero svolgere la stessa funzione proteolitica (Arnason and Ellison, 1994; Johnson et al., 1995); viceversa è stato dimostrato che i legami che sfruttano altri residui di lisina per formare catene di poliubiquitina, quali Lys63 (Deng et al., 2000; Wang et al., 2001; Geetha et al., 2005; Adhikary et al., 2005; Herman-Bachinsky et al., 2007; Scialpi et al., 2008), Lys29/33 (Chastagner et al., 2006; Al-Hakim et al., 2008) e Lys6 (Nishikawa et al., 2004) sono implicati nella regolazione di processi cellulari proteolisi-indipendenti quali cambiamenti dell'attività proteica o della localizzazione subcellulare ed interazioni proteina-proteina (Shenell and Hicke, 2003) (Figura 7). In particolare, la formazione di catene di poliubiquitina che utilizzano il residuo Lys63 è stata associata alla regolazione della risposta al danno al DNA, della risposta infiammatoria, dell'endocitosi ed della sintesi di proteine ribosomiali (Pickart and Fushman., 2004).

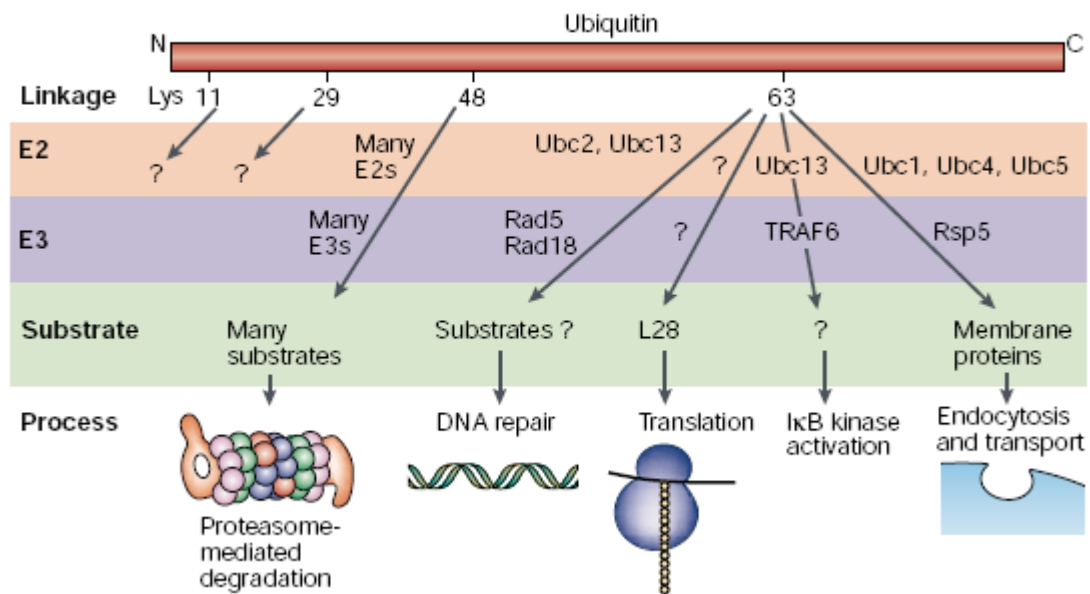


Figura 7: Differenti funzioni esercitate dall'ubiquitina. E' riportata una rappresentazione schematica dell'ubiquitina e dei diversi legami che può formare. L'ubiquitina è costituita da diversi residui di lisina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 e Lys63) in grado di formare catene di multiubiquitinazione. Le funzioni svolte dalle catene che utilizzano i residui Lys6, Lys11, Lys27, Lys29 e Lys33 non sono ancora note. La Lys 48 marca le proteine substrato per la degradazione mediata dal proteosoma, mentre i legami che utilizzano la Lys63 possono servire per numerose funzioni: il riparo al DNA, l'endocitosi e il trasporto vescicolare, la funzione ribosomiale e l'attivazione di chinasi (Weissman, 2001)

1.5.3 Enzimi coinvolti nella reazione di ubiquitinazione

Come già introdotto, l'ubiquitinazione è un processo multi-step che coinvolge tre diverse classi di enzimi (E1, E2 ed E3).

L'enzima E1 esiste in forma unica nel lievito, mentre nelle cellule di mammifero ne sono stati identificati almeno dieci.

La funzione dell'enzima E1 è quella di attivazione della molecola di ubiquitina. Questo meccanismo avviene attraverso il legame sequenziale tra l'E1, il complesso MgATP e l'ubiquitina, l'interazione determina la formazione di un intermedio ubiquitina-adenilato che servirà come donatore di ubiquitina al residuo di cisteina presente sul sito attivo dell'E1 stesso. Quindi ciascun E1 può legare contemporaneamente 2 molecole di ubiquitina: una come adenilato e l'altra come tioestere. Successivamente la molecola di ubiquitina "attivata" legata al gruppo tiolo, viene trasferita all'enzima di coniugazione E2 (Haas and Rose, 1982; Hershko et al., 1983). L'E1 è altamente efficiente ciò permette la produzione di un'elevata quantità

di ubiquitina attivata che può essere così rapidamente coniugata all'E2 (Haas and Rose, 1982).

Sono stati descritti 11 enzimi E2 nel lievito ed almeno cento negli altri organismi superiori, la loro architettura di base risulta comunque essere altamente conservata: nel dominio centrale, costituito da circa 150 residui aminoacidici, è presente la cisteina catalitica responsabile dell'interazione con l'ubiquitina precedentemente attivata dall'enzima E1, in questo stesso dominio sono anche localizzati i residui coinvolti nell'interazione con l'enzima E1 (Hauser et al., 1998). Il meccanismo d'azione prevede il legame tra l'E2 e il complesso E1-ubiquitina. Questa interazione risulta molto efficiente paragonata alle singole interazioni tra E2 e ubiquitina libera, e tra E2 ed E1 privo di ubiquitina. Come già verificato nella prima reazione del processo di ubiquitinazione, anche in questo secondo caso, il trasferimento dell'ubiquitina dall'enzima E1 all'enzima E2, risulta essere particolarmente rapido, permettendo la produzione di notevoli quantità di ubiquitina "attivata" che può essere così utilizzata dagli enzimi E3 (Hershko et al., 1983). L'ultima fase del processo di ubiquitinazione che determina il trasferimento ultimo dell'ubiquitina dall'E3 al substrato, risulta infatti essere la reazione più specifica e la più lenta: tutte queste osservazioni portano ad attribuire una funzione fondamentale agli enzimi E3 ubiquitina ligasi.

La specificità della reazione di ubiquitinazione è conferita dall'enzima E3, che è responsabile del riconoscimento e del legame di un unico o di un gruppo ristretto di substrati ed è in grado di cooperare con uno o pochi enzimi E2 per il trasferimento al substrato dell'ubiquitina attivata. Ad oggi sono state identificate circa un migliaio di E3 che sono state classificate in tre gruppi principali descritte nel paragrafo successivo: le E3 ligasi di tipo HECT, di tipo RING-finger e di tipo U-box.

1.5.4 Le E3 ubiquitina ligasi

E3 di tipo HECT

Le E3 di tipo HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus), sono proteine monomeriche che condividono una comune struttura modulare (Huibregtse et al., 1995); in particolare, tutte possiedono un dominio catalitico C-terminale denominato HECT, originariamente caratterizzato nella proteina E6-AP (E6 associated-protein), che

è responsabile dell'interazione con l'E2 e contiene il residuo di cisteina necessario per il legame con l'ubiquitina ed il suo trasferimento al substrato proteico (Weissman, 2001).

La specificità nei confronti dei differenti substrati, viene conferita alle E3 di tipo HECT dalla presenza di diversi domini di interazione proteina-proteina; in particolare le E3 di tipo HECT sono state ulteriormente suddivise in tre sottofamiglie, in base al motivo strutturale utilizzato per il riconoscimento del substrato: le HERC E3 contenenti domini RCC1-simili (RLD), le C2-WW-HECT formate da domini triptofano-triptofano (WW) e le SI(ngle)-HECT E3 in cui sono assenti sia il dominio RLD, sia i domini WW (Scheffner and Staub., 2007). Le E3 C2-WW-HECT posseggono da 2 a 4 domini WW posizionati nella regione centrale della proteina ed un ulteriore dominio conservato all'estremità N-terminale, denominato C2. Si tratta di un dominio di legame al calcio e ai fosfolipidi, coinvolto nella localizzazione della proteina a livello delle membrane cellulari (Weissman, 2001) (Figura 8).

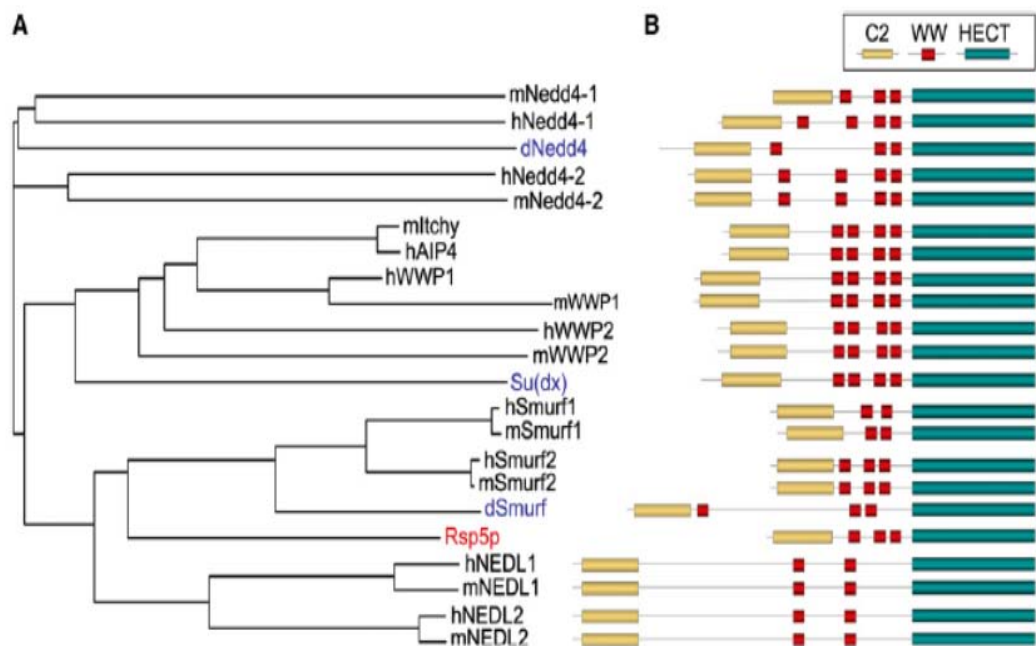


Figura 8: Relazione filogenetica tra i membri della famiglia delle E3 C2-WW-HECT. A) Ortologhi di Nedd4 sono stati identificati in lievito (rosso), in Drosophila (blu) in topo e nell'uomo (nero). Itch forma un cluster insieme a WWP1 e a WWP2, mentre Nedd4-1, Nedd4-2, le Smurf, NEDL1 e NEDL2 formano 2 cluster separati. B) La struttura modulare delle E3 C2-WW-HECT è costituita da un dominio N-terminale Ca^{2+} /lipid binding (C2) (rettangoli gialli), una regione centrale contenente multipli domini WW (quadrati rossi) e un dominio HECT all'estremità C-terminale (rettangoli verdi) (Bernassola et al., 2008).

Le ligasi HECT sono le uniche tra le E3 a possedere un'attività catalitica intrinseca. Durante la reazione di ubiquitinazione interagiscono con l'enzima E2 attraverso il dominio HECT, ricevono dall'E2 l'ubiquitina attivata e la trasferiscono

direttamente alla molecola substrato. Le reazioni di trasferimento dell'ubiquitina dall'E2 al substrato coinvolgono un residuo di cisteina catalitica localizzato nel dominio HECT della E3. Da un punto di vista funzionale, le HECT E3 sono implicate sia in reazioni di monoubiquitinazione attraverso le quali regolano i processi di endocitosi e di smistamento proteico (Levkowitz et al., 1999; Haglund et al., 2003; Di Fiore et al., 2003), oppure possono catalizzare la formazione di catene di poliubiquitina, regolando in questo modo la stabilità proteica di recettori transmembrana o di proteine intracellulari.

Le più studiate tra le E3 di tipo HECT sono le C2-WW-HECT il cui prototipo strutturale è considerato Nedd4 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4) (Figura 9).

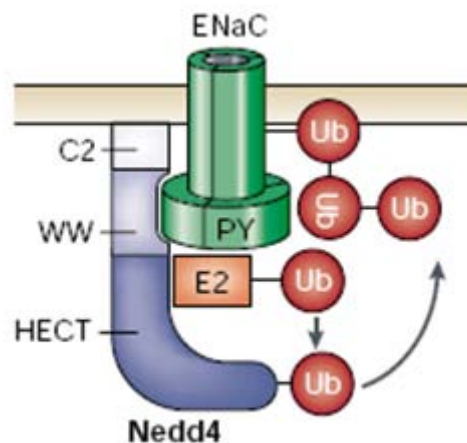


Figura 9: E3 HECT: Nedd4 Nedd4 è il prototipo strutturale delle C2-WW-HECT ligasi. E' costituito dal dominio C2 in grado di mediare l'interazione con la membrana tramite un meccanismo Ca^{2+} -dipendente, dai domini WW di interazione con la regione PY del substrato e dal dominio HECT responsabile del legame con l'E2. (Weissman, 2001)

La proteina Nedd4 è stata inizialmente identificata come responsabile della regolazione dei fluidi e dell'omeostasi elettrolitica, grazie alla capacità di controllare i canali epiteliali del sodio (EnaC) (Staub et al., 1997; Harvey et al., 1999). Studi più recenti ne hanno attribuito un ulteriore ruolo nella tumorigenesi: Nedd4 è stata infatti identificata come la ligasi del fattore oncosoppressore PTEN (Wang et al., 2007; Trotman et al., 2007). Che antagonizzare le vie di segnale che portano alla sopravvivenza cellulare dipendenti dalla chinasi AKT/PI3K (fosfatidilinositolo 3-

chinesi). Una regolazione aberrante di PTEN, causata dall'overespressione di Nedd4, può quindi promuovere la sopravvivenza cellulare AKT-dipendente (Wang et al., 2007).

E3 di tipo HECT: Itch

Alla medesima sottofamiglia appartiene l'enzima Itch, una E3 ampiamente studiata e caratterizzata nel nostro laboratorio, che costituisce in parte, l'oggetto di studio del lavoro sperimentale descritto in questa tesi.

La proteina Itch è stata inizialmente identificata mediante lo studio dei topi mutanti “non-agouti-lethal 18H” o topi *Itchy*, che in seguito ad una inversione cromosomica indotta da radiazioni non esprimono più i geni *agouti* e *Itch* (Perry et al., 1998). La mutazione determina una colorazione del pelo più scura, inoltre, studi condotti su topi deleti per Itch, hanno evidenziato la formazione spontanea di malattie autoimmuni caratterizzate da una proliferazione linfatica nella milza, nei linfonodi e nella medulla del timo, oltre ad un'infiammazione polmonare cronica (Perry et al., 1998).

Diversi substrati della ligasi Itch sono stati identificati e sono per lo più coinvolti nella risposta immunitaria, nell'apoptosi e nel traffico vescicolare.

Tra i diversi substrati di Itch sono stati ampiamente studiati i modulatori della risposta immunitaria, in particolare i membri della famiglia di Jun: c-Jun e JunB (Fang et al., 2002; Fang and Kerppola, 2004). La proteina JunB è coinvolta nel differenziamento delle cellule T_H2 , attraverso la regolazione trascrizionale dei promotori dell'interleuchina-4 (IL-4) e dell'interleuchina-5 (IL-5). In condizioni stazionarie, JunB viene regolato dalla ligasi Itch, che ne media la degradazione proteosoma-dipendente, ciò contribuisce al mantenimento di basse concentrazioni di IL-4 e alla conseguente attenuazione del differenziamento delle cellule T_H2 (Li et al., 1999; Hartenstein et al., 2002). Una de-regolazione di JunB causa un incremento del differenziamento delle cellule T_H2 , con successiva iperproliferazione delle cellule T ed una risposta allergica anormale (Fang et al., 2002). Anche c-jun è stato identificato essere un substrato della ligasi e la sua ubiquitinazione ad opera di Itch stesso media la degradazione lisosoma-dipendente (Fang and Kerppola, 2004).

Itch risulta essere coinvolto anche in altri processi biologici, quali ad esempio il mantenimento dell'anergia delle cellule T: l'induzione dell'anergia avviene ad opera della stimolazione dei TCR, presenti sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC), e determina un'aumento del messaggero di Itch. In queste condizioni Itch non solo è maggiormente trascritto, ma viene anche traslocato dal citoplasma al compartimento endosomiale dove può esercitare la sua funzione di ligasi nei confronti dei substrati: la fosfolipasi C- γ 1 (PLC- γ 1) e la proteina chinasi θ (PKC- θ). I due substrati subiscono una monoubiquitinazione ad opera di Itch, che permette loro di sottostare ad un traslocazione vescicolare con trasferimento nel lisosoma e successiva degradazione (Heissmeyer et al., 2004). La riduzione dell'espressione dei due substrati interferisce con la funzionalità delle sinapsi immunologiche che a loro volta sono coinvolte nel signaling e nella proliferazione delle cellule T. Esperimenti *in vivo* condotti in topi deleti geneticamente per Itch, mostrano una resistenza all'induzione dell'anergia. Tutti questi dati sono consistenti nell'attribuire ad Itch una funzionalità nella risposta immunologica (Mueller 2004).

Recenti lavori hanno attribuito un ruolo della ligasi anche nel controllo del traffico vescicolare di recettori: la proteina ErbB-4, appartiene alla famiglia ErbB dei recettori dei fattori di crescita (EGFR). ErbB-4 in seguito all'interazione con il suo ligando viene clivata in un frammento IC, in grado di traslocare nel nucleo, interagire con il coattivatore YAP (proteina associata a Yes) ed infine indurre attività trascrizionale. La ligasi Itch è in grado di interagire con ErbB-4 competendo con la proteina YAP, con conseguente sequestro di ErbB-4 nel citoplasma e inibizione della sua attività trascrizionale (Sundvall et al., 2008).

Un ulteriore ruolo attribuito alla HECT ligasi Itch, risulta essere nell'induzione della risposta apoptotica attraverso due meccanismi distinti. La proteina c-FLIP_L, inibitore della caspasi-8, è un substrato di Itch: in seguito a trattamento delle cellule con il fattore TNF α si ha un'induzione della morte cellulare per apoptosi, evento dovuto anche all'azione catalitica di Itch esercitata nei confronti della proteina c-FLIP_L. Studi condotti *in vivo* su topi Itch KO, hanno messo in luce come l'apoptosi indotta negli epatociti in seguito all'azione di TNF α sia prevenuta con conseguente protezione nei confronti di un'epatite fulminante (Chang et al., 2006).

I membri della famiglia di p53 risultano essere substrati della ligasi e come tali vengono degradati dal proteosoma in seguito a poliubiquitinazione Itch-dipendente (Rossi et al., 2005; Rossi et al., 2006), come descritto nel paragrafo 1.5.5.

L'attività catalitica e la capacità di Itch di reclutare i suoi substrati, sono soggette a diversi livelli di regolazione, compresi modificazioni post-traduzionali, come la fosforilazione, e interazione con proteine adattatrici.

Itch sottostà ad eventi di fosforilazione da parte della chinasi Jun N-terminale1 (JNK1), in particolare la chinasi catalizza la fosforilazione di 3 residui Ser/Thr presenti all'interno del dominio HECT di Itch. La modificazione post-traduzionale determina un cambiamento conformazionale della ligasi, tale da permettere il successivo reclutamento e interazione con i vari substrati (Gallagher et al., 2006) (Figura 10). In particolare l'induzione della chinasi JNK1, determina un incremento dell'attività catalitica di Itch, con conseguente aumento della degradazione dei membri della famiglia di Jun nonché controllo del differenziamento delle cellule T_H2 , come precedentemente illustrato (Gao et al., 2004) (Figura 10).

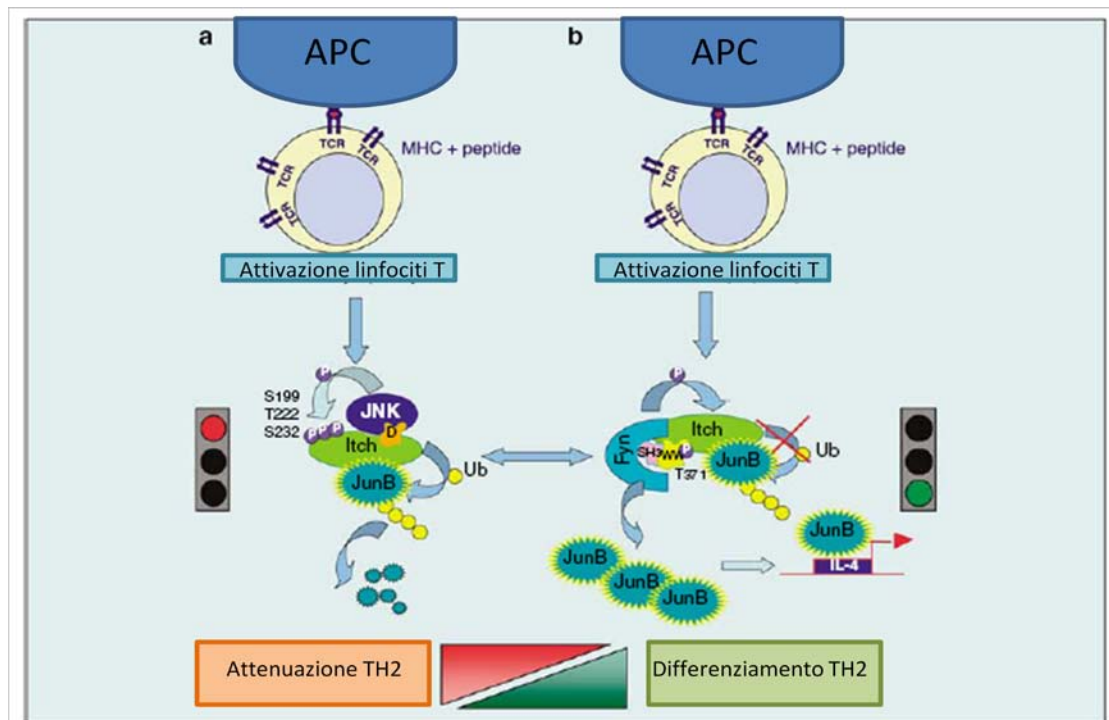


Figura 10: Regolazione della produzione delle cellule T_H2 Itch-dipendente. La stimolazione delle cellule T ha inizio in seguito all'attivazione della cascata JNK/MAPK e culmina nella degradazione di JunB ad opera dell'ubiquitinazione Itch-mediata. La fosforilazione di Itch nei residui S199, T222 e S232 è responsabile dell'attivazione della ligasi stessa che ubiquitina JunB. Conseguentemente si ha una riduzione della produzione di IL-4 e un'attenuazione della produzione di T_H2 . L'induzione del differenziamento delle cellule T_H2 è promosso dall'azione della chinasi Src Fyn. Fyn fosforila il residuo Tyr 371 di Itch, inibendo l'interazione tra Itch e JunB. Successivamente JunB può indurre l'IL-4 che accelera il differenziamento delle cellule T_H2 (Melino et al., 2008).

Itch subisce anche un evento di fosforilazione ad opera di una Src chinasi, Fyn nel residuo Tyr371. Questa modificazione determina però un'inibizione dell'attività

catalitica di Itch stesso che si riflette nell'induzione del differenziamento delle cellule T_H2 (Yang et al., 2006) (Figura 10).

Le HECT ligasi come descritto precedentemente sono in grado di ricevere molecole di ubiquitina sul loro sito catalico posizionato nel dominio HECT direttamente dall'enzima di coniugazione E2, successivamente l'ubiquitina attivata può essere trasferita sui diversi substrati. Questo meccanismo è alla base della capacità delle HECT ligasi di autoubiquitinarsi. E' stato dimostrato come in realtà l'autoubiquitinazione di Itch non sia responsabile della regolazione della stabilità della proteina stessa, in quanto prevede l'utilizzo del residuo Lys63 (Scialpi et al., 2008). Ulteriori studi condotti precedentemente avevano messo in luce l'esistenza di una de-ubiquitinilasi FAM/USP9X, che al contrario sembrerebbe agire proteggendo Itch dalla degradazione proteosoma-dipendente (Mouchantaf et al., 2006).

La regolazione della ligasi Itch, viene affidata anche all'interazione con particolari proteine.

La proteina legante Nedd4 (N4BP1) è un nuovo interattore di Itch, che svolge un effetto inibitorio nei confronti dell'attività di ubiquitinazione di Itch stesso, in particolare attraverso un meccanismo di competizione la suddetta proteina impedisce ai diversi substrati di Itch (p73, p63, c-Jun e JunB) di essere poliubiquitinati e di conseguenza degradati (Oberst et al., 2007).

La proteina interattore della famiglia Nedd4-1 (Ndfip1), agisce al contrario promuovendo la degradazione dei substrati di Itch. Le due proteine interagiscono in seguito a stimolazione delle cellule T, il legame determina un cambiamento nella localizzazione di Itch, che dalle vescicole intracellulari viene trasferito alla superficie interna della membrana plasmatica, con conseguente aumento della degradazione di JunB nonché con una diminuzione della produzione di citochine T_H2 (Jolliffe et al., 2000; Oliver et al., 2006).

E3 di tipo RING-finger

La famiglia delle proteine del tipo RING-finger rappresenta il più numeroso gruppo di E3, che ne include almeno cento diversi enzimi. Al contrario delle E3 ligasi di tipo HECT, le E3 del tipo RING-finger non possiedono un'attività catalitica intrinseca, ma piuttosto agiscono da "sostegno molecolare", facilitando l'interazione tra l'enzima E2 ed il substrato.

Il dominio RING-finger è costituito da 8 residui di cisteina e di istidina altamente conservati, coordinati insieme dalla presenza di due atomi di zolfo, a formare una struttura a ponte che serve per un adeguato ripiegamento dell'enzima e per l'interazione con l'E2 (Borden and Freemont, 1996). Il riconoscimento e il successivo legame tra l'E3 e i suoi diversi substrati, avviene tramite la giustapposizione tra l'E3 e una specifica regione di "ubiquitinazione" presente nelle proteine bersaglio. Inoltre generalmente l'interazione coinvolge altre proteine con funzione mediatrice, e può richiedere delle modificazioni post-traduzionali che riguardano i diversi substrati. Alcuni esempi verranno descritti nel dettaglio in seguito.

Le E3 del tipo RING-finger possono a loro volta essere suddivise in proteine monomeriche, oppure in complessi proteici costituiti da subunità multiple.

E3 del tipo RING-finger monometriche

Le E3 RING-finger monomeriche sono costituite da una singola subunità che contiene sullo stesso polipeptide l'elemento di riconoscimento del substrato (BIR) e il dominio RING-finger.

Alla famiglia di proteine monomeriche appartengono la proto-oncoproteina c-Cbl, responsabile dell'ubiquitinazione dei recettori dei fattori di crescita, le proteine inibitori dell'apoptosi (IAPs) e l'oncoproteina Mdm2 che ubiquitina il fattore trascrizionale p53.

I membri della famiglia di Cbl, sono stati originariamente identificati come proteine con funzione di adattatore, in seguito sono state riscontrate essere delle E3 RING ligasi responsabili dell'endocitosi e della degradazione dei recettori delle tirosin chinasi (RTK) (Dikic, 2003; Marmor and Yarden, 2004). Cbl riconosce il residuo di tirosina delle RTK attivato tramite fosforilazione, e interagisce con questa mediante il dominio di legame SH2 (Src homology 2) posizionato all'estremità N-terminale, il legame media poi la successiva ubiquitinazione del substrato stesso (Rao et al., 2002; Thien and Langdon, 2001).

Un'altra E3 notevolmente studiata per via della sua capacità di regolare la stabilità proteica del noto fattore di trascrizione p53 è Mdm2 (Fang et al., 2000; Honda and Yasuda, 2000) (Figura11).

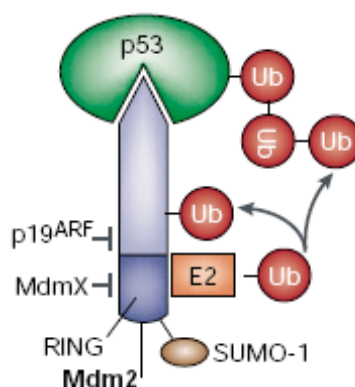


Figura 11: E3 RING monomeric: Mdm2 La ligasi Mdm2 è costituita dal dominio RING responsabile dell'interazione con l'E2 e dal dominio di interazione con il substrato p53. L'attività della ligasi è inibita da MdmX e da p19^{ARF} (Weissman, 2001).

Il “turnover” proteico di p53 è infatti regolato dalla ligasi Mdm2 (mouse double minute2). La ligasi è costituita dal dominio RING, presente all'estremità C-terminale e dal dominio di legame a p53, posizionato invece nell'estremità amino-terminale. L'interazione ligasi-substrato avviene tramite il riconoscimento del segnale di ubiquitinazione di p53, presente nella suo dominio di transattivazione TA. In seguito all'interazione tra le due proteine, p53 può essere alternativamente monoubiquitinata (quando la concentrazione di Mdm2 è bassa), oppure poliubiquitinata (quando i livelli della ligasi aumentano) e successivamente degradata (Li et al., 2003). La reazione descritta viene però inibita dall'attivazione del fattore p53 in seguito a danno al DNA o a stimoli genotossici: l'attivazione prevede la fosforilazione di residui di serina posizionati nel dominio TA di p53, tale modificazione post-traduzionale impedisce l'interazione tra Mdm2 e p53, con conseguente aumento della stabilità di p53 stesso (Michael and Oren, 2002; Moll and Petrenko, 2003).

E3 del tipo RING-finger multimeriche

I complessi multimerici RING-finger sono stati inizialmente identificati per la presenza di un dominio di legame allo zinco di tipo RING-finger, responsabile dell'interazione con l'enzima di coniugazione E2 (Joazeiro and Weissman, 2000). Prendono comunemente anche il nome di E3 ligasi cullina-dipendenti (CDL) a causa della loro peculiare struttura che comprende le proteine Roc e le culline. Le proteine Roc sono piccoli polipeptidi in cui è situato il dominio RING, direttamente in grado di interagire con le E2; le culline invece, costituiscono una famiglia di proteine

strettamente correlate (cullina 1, 2, 3, 4a, 4b, 5 e 7) a cui appartengono anche le proteine Apc2 (subunità del complesso promuovente l'anafase/ciclosoma APC/C) e Parc, la cui funzione di base è quella di fornire un sostegno molecolare a tutto il complesso, favorendo inoltre l'avvicinamento tra l'enzima E2, legato al dominio RING, e le proteine substrato, in grado di interagire con il complesso attraverso una o più molecole adattatrici direttamente legate alla cullina (Zachariae et al., 1998; Yu et al., 1998; Nikolaev et al., 2003) (Figura 12).

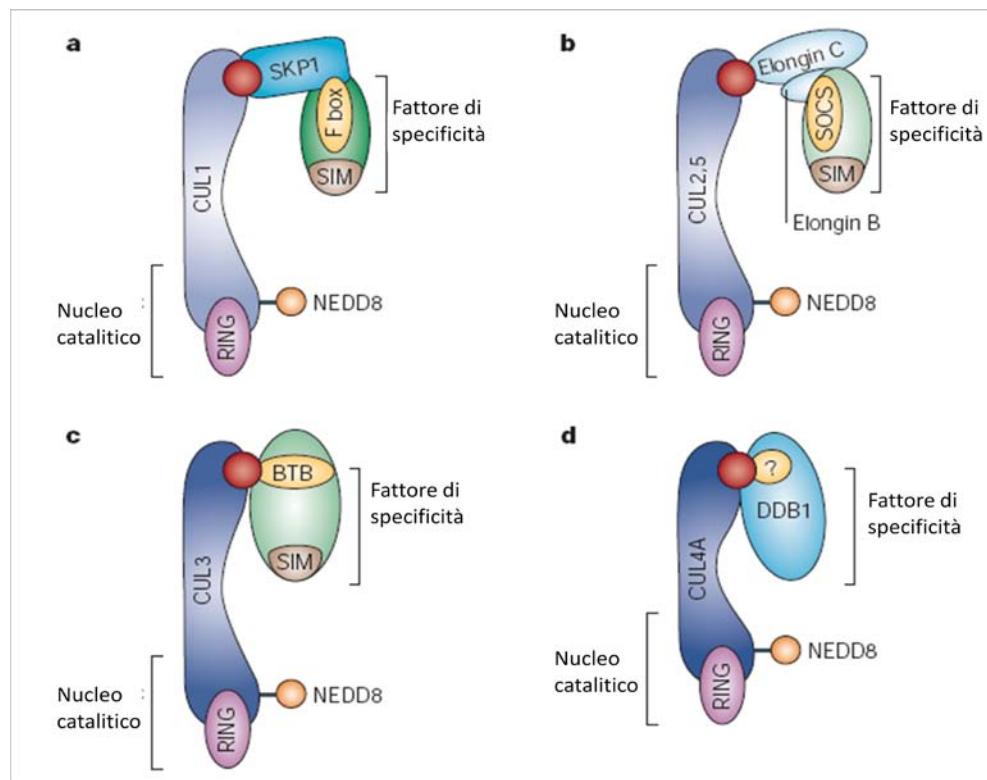


Figura 12: Struttura modulare dei complessi CDL. Le CDL sono costituite da una struttura catalitica centrale formata dalla cullina e da una proteina contenente il dominio RING-finger. I recettori o i fattori di specificità per il riconoscimento del substrato, sono indicati in verde e contengono un dominio all'N-terminale, in giallo, che lega la molecola adattatrice, in azzurro. La regione all'estremità C-terminale del recettore serve per l'interazione con il substrato. Nei complessi SCF (a) la molecola adattatrice Skp1 lega un dominio di 40 residui aminoacidici: il motivo Fbox. La cullina 2 (b) e la cullina 5 (b) legano la molecola adattatrice elonghina BC e usano come fattori di specificità proteine con il motivo SOC (suppressor of cytokine signalling). La cullina 3 (c) lega un'unica proteina costituita dal dominio BTB (Tramtrack, Bric-a-brac). La cullina4a (d) lega la proteina DDB1 (DNA damage binding protein) che può funzionare da fattore di specificità legando direttamente i substrati o alternativamente può funzionare da recettore interagendo con DDB2 che a sua volta recluta il substrato.

Le diverse CDL mostrano un'architettura di base simile, ed il complesso maggiormente studiato è l'SCF costituito dai membri: SKP1-Cullina1-Rbx1-proteina Fbox (Figura 13).

La proteina Rbx1 è costituita da 108 residui e contiene il dominio RING, la suddetta proteina interagisce con l'estremità C-terminale della cullina1. La cullina1 è costituita da 776 residui ed è in grado di legare attraverso la sua porzione N-terminale, l'adattatore SKP1. L'adattatore è un piccolo polipeptide in grado di riconoscere e legare le diverse proteine Fbox (Bai et al., 1996; Kamura et al., 1999; Ohta et al., 1999).

Le proteine Fbox sono caratterizzate da un dominio all'estremità N-terminale di 40 residui responsabile dell'interazione con SKP1, seguito da una regione di interazione proteina-proteina ricco in leucine, oppure costituita da ripetizioni WD-40 in grado di legare i diversi substrati (Bai et al., 1996; Skowyra et al., 1999). Data la loro struttura, le Fbox possono così legare solo determinati substrati conferendo specificità al complesso SCF.

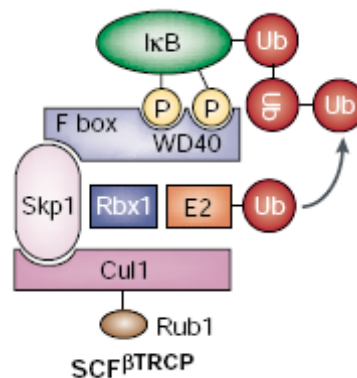


Figura13: E3 ring multimerica: SCF^{βTRCP}. SCF^{βTRCP} è il prototipo delle ligasi E3 multimeriche costituite dalla cullina (CDL). E'costituito da SKP1 in grado di reclutare le diverse Fbox, Rbx1 che serve per il legame con l'E2 e dalla Cul1 che fornisce il sostegno strutturale a tutto il complesso. (Weissman, 2001)

Alcune SCF umane sono state studiate dettagliatamente e comprendono l'SCF^{Skp2}, responsabile dell'ubiquitinazione dell'inibitore delle Cdk, p27, l'SCF^{b-TrCP} che ubiquitina la β-catenina e il fattore IκB e l'SCF^{Fbw7} che regola la ciclina E (Deshaies, 1999; Koepp et al., 2001).

Tra le numerose funzioni svolte dagli SCF, ricordiamo un ruolo preponderante nel controllo del ciclo cellulare tramite l'ubiquitinazione di fattori quali p21, p27, ciclinaE e nella replicazione del DNA tramite il controllo della stabilità di proteine quali E2F, CDT1 (Deshaies, 1999; Cardozo and Pagano, 2004).

Il riconoscimento da parte delle E3 ligasi in particolare dalle specifiche Fbox, può richiedere anche modificazione post-traduzionali generalmente subite dai vari substrati: la fosforilazione è tra queste la maggiormente osservata oltre alla coniugazione

ad oligosaccaridi ricchi di mannosio, o all'idrossilazione, o all'acetilazione, o alla sumoilazione o ancora alla metilazione (Yoshida et al., 2003; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Tutte queste modificazioni hanno luogo in seguito a specifici stimoli ed in determinate condizioni contribuendo al rigido controllo e alla selettività della reazione. Sono noti però anche esempi in cui i substrati non subiscono alcuna modificazione e vengono ugualmente reclutati dalle E3 (Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003).

L'attività catalitica dei complessi SCF, è rigidamente controllata da diversi meccanismi. Uno di questi comporta il legame con un omologo dell'ubiquitina, la proteina Nedd8 (N8). La reazione di neddilazione prevede il legame covalente della molecola N8 ad un residuo di lisina conservato presente nella cullina (Osaka et al., 2000). La reazione di neddilazione è responsabile dell'induzione dell'attività ligasica della cullina1, in quanto aiuta e facilita il reclutamento dell'enzima E2 sulla cullina stessa (Podust et al., 2000; Read et al., 2000; Wu et al., 2000; Kawakami et al., 2001). Un'altra funzione esercitata dalla proteina N8 consiste nell'impedimento dell'interazione tra il complesso SCF e il fattore CAND-1: CAND-1 compete con SKP1 per il legame alla cullina, impedendo quindi il successivo reclutamento della Fbox. In particolare CAND1 non è in grado di interagire con la CUL1, se questa è modificata dall'interazione con N8, in conseguenza di ciò la neddilazione costituisce un ulteriore meccanismo di attivazione del complesso SCF (Liu et al., 2002; Zheng et al., 2002) (figura14).

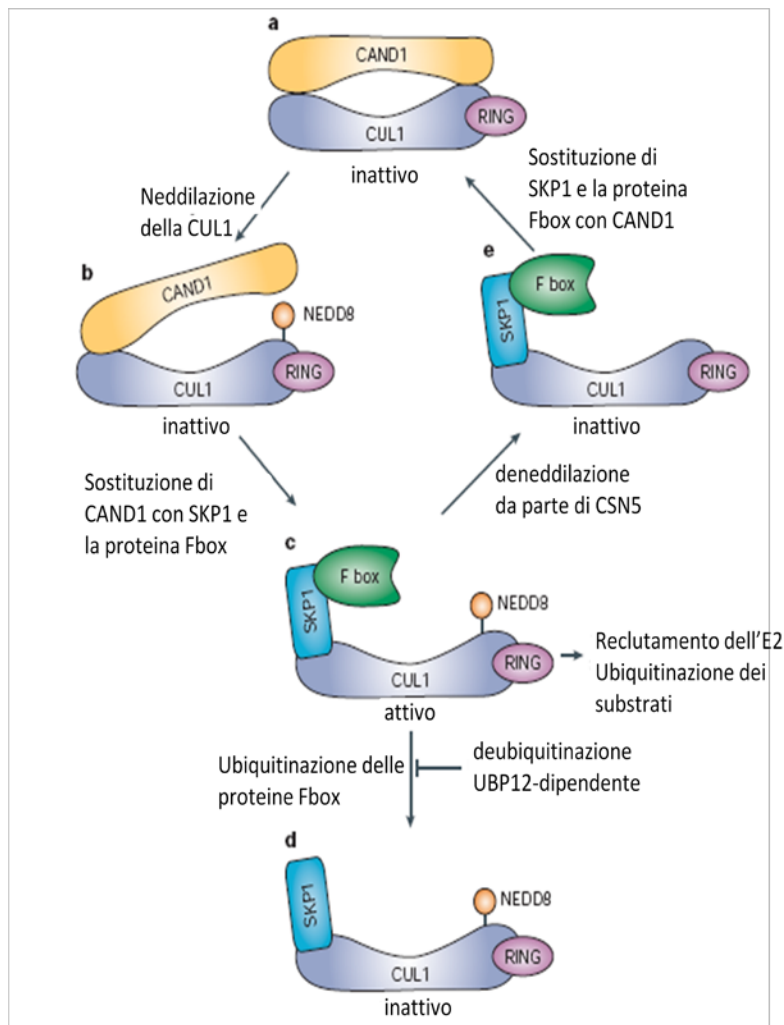


Figura 14: La regolazione dell'attività delle ligasi RING multimeriche attraverso CAND1 e Nedd8. Cicli di legame e rilascio di Nedd8 risultano importanti nella regolazione delle ligasi CRL. Il complesso enzimatico SCF (SKP1, CUL1 e Fbox) associato a CAND1 si trova in uno stato inattivo (a). Il legame di Nedd8 al complesso provoca il distacco di CAND1 (b) e favorisce il reclutamento dei substrati "attivando" il complesso affinché possa ubiquitinare i propri substrati (c). La deubiquitinasi UBP12 regola l'abbondanza dei substrati interferendo con la stabilità delle Fbox (d). L'isopeptidasi CSN5 può de-neddlare la Cul1 facilitando la dissociazione di SKP1 e il legame a CAND1(e). (Petroski and Deshaies, 2005).

E3 del tipo RING-finger multimeriche: CDL4a

Alle E3 ligasi cullina-dipendenti (CDL) appartiene anche il complesso CDL4a, che è stato studiato nel nostro laboratorio ed in particolare è oggetto di studio della seconda parte del mio progetto di dottorato.

Il complesso multimerico CDL4a è costituito dalla cullina4a, questa proteina è un membro della famiglia delle culline e come tale mostra una sostanziale omologia con la cullina1. Di conseguenza tutta l'architettura del complesso, nonché la capacità e funzionalità dell'enzima stesso è sostanzialmente simile a quella esercitata dal

complesso SCF costituito dalla cullina1, da SKP1 e da differenti F-box (Petroski and Deshaies, 2005).

Come descritto in precedenza, le culline sono in grado di interagire con l'enzima di coniugazione E2, attraverso delle proteine che contengono un dominio di tipo RING finger. In particolare nel complesso CDL4a, questo compito è affidato alla proteina ROC1. ROC1 è una proteina di tipo RING-H2 responsabile del reclutamento e dell'attivazione dell'enzima E2 (figura15).

Il reclutamento dei diversi substrati da parte del complesso CDL4a è invece affidato alla proteina DDB1 identificata originariamente come componente del complesso UV-DDB formato dalle proteine in grado di interagire con il DNA danneggiato (damaged DNA-binding proteins: DDB1 e DDB2) (Chu and Chang, 1988) (figura 15).

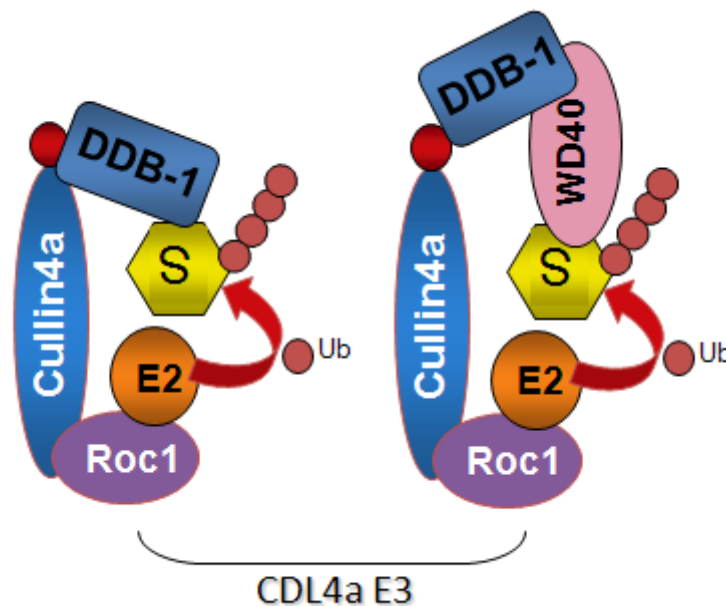


Figura 15: Struttura delle CDL4a E3 ligasi. Le CDL4a sono costituite nella regione centrale dalla cul4a, che esercita una funzione strutturale. La cul4a interagisce all'estremità C- terminale con la proteina ROC1 costituita dal dominio RING che serve per il reclutamento dell'E2, mentre attraverso l'estremità N-terminale lega il fattore DDB1. DDB1 può funzionare come fattore di specificità legando direttamente i substrati (A), o in alternativa può funzionare da recettore interagendo con fattori costituiti dal dominio WD40 che a loro volta reclutano il substrato.

Il complesso E3 ligasi costituito da cul4a, ROC1 e UV-DDB (DDB1 + DDB2), viene attivato in seguito a radiazioni UV, tramite il legame con la molecola Nedd8. Studi condotti inizialmente da Groisman et al (2003), hanno permesso di verificare un'attività

di ubiquitinazione del complesso ed inoltre hanno portato all'identificazione del primo substrato della suddetta ligasi (Groisman et al., 2003). In seguito a radiazioni UV vengono innescati meccanismi deputati al riparo del DNA stesso, uno di questi è il riparo in seguito ad excisione nucleotidica (NER), durante la risposta il complesso Cul4a-ROC1-DDB1-DDB2 (CDL4a-DDB2) viene attivato ed è in grado di ubiquitinare la proteina XPC (Xeroderma pigmentosum group C protein) che viene richiamata sul DNA danneggiato e a sua volta innesca i segnali di riparo (Sugasawa et al., 2005). Parallelamente anche la proteina DDB2 viene ubiquitinata da CDL4a e successivamente degradata con una via dipendente dal proteasoma (Sugasawa et al., 2005) (Figura 16). L'esempio illustrato mette in luce la capacità di DDB1 di poter alternativamente agire come adattatore del complesso CDL4a, nel caso dell'ubiquitinazione di XPC, funzione analogamente svolta da SKP1 nel complesso SCF, o come recettore nel caso della modificazione su DDB2 (Figura 15).

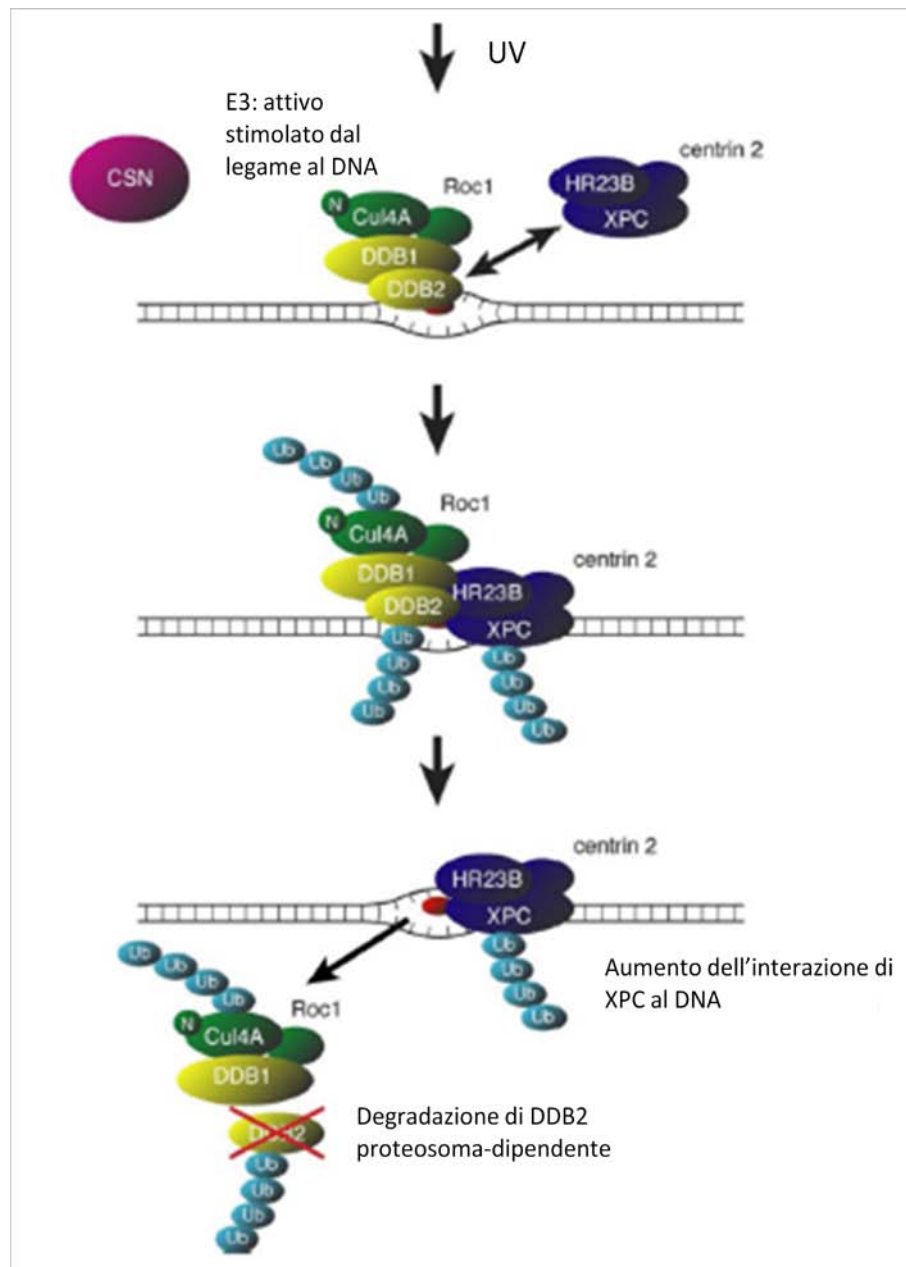


Figura 16: Modello dell'ubiquitinazione di XPC UV-DDB-dipendente. In seguito ad irradiazione con UV, il complesso UV-DDB associato all'E3 viene trasferito sulla regione di cromatina danneggiata e viene attivato in seguito al legame con N8. UV-DDB-E3 attivato recluta XPC e lo ubiquitina, inoltre vengono ubiquitinati anche altri componenti del complesso: DDB2 e la Cul4a. DDB2 ubiquitinato perde le sue caratteristiche di interattore del DNA, si dissocia dal filamento danneggiato e subisce degradazione proteosoma-dipendente. XPC ubiquitinato, al contrario interagisce con il DNA e contribuisce al richiamo dei fattori coinvolti nel riparo al danno. (Sugasawa et al., 2005).

Un ulteriore esempio in cui viene illustrata la capacità di DDB1 di funzionare come un adattatore è nella formazione del complesso CDL4a-CSA. La proteina CSA (Cocayne syndrome proteina A) è responsabile del reclutamento della RNA polimerasi in seguito a danno in risposta a radiazioni UV o all'azione di agenti chimici (Groisman et al., 2003).

La struttura di DDB1 però non coincide con quella di SKP1 o di altri adattori delle culline (elonghina C o i domini BTB) (Shiyanov et al., 1999; Ulane et al., 2002; Wertz et al., 2004), DDB1 infatti, non contiene il dominio BTB/POZ, necessario per l'interazione tra SKP1 e la CUL1, ma al contrario è costituito da un cluster di tre eliche beta (BPA, BPB, BPC) che permettono l'assunzione di varie conformazioni e una varietà nel riconoscimento di interattori e conseguente variabilità nell'attività di ubiquitinazione (Angers et al., 2006; Li et al., 2006).

La funzione di recettore da parte di DDB1 nei confronti del complesso CDL4a, inoltre risulta essere ben documentata in quanto studi condotti tramite delezione di DDB1, hanno verificato una compromissione della proteolisi di numerosi substrati della cul4a *in vivo* (Hu et al., 2004; Angers et al., 2006; Higa et al., 2006; Jin et al., 2006), oltre ad un'alterata attività di ubiquitinazione cul4a-dipendente *in vitro* (Hu et al., 2004; Banks et al., 2006).

L'interazione tra il complesso CDL4a e i suoi substrati avviene tramite un dominio WD40, costituito da 40 a 60 residui aminoacidici con un dipeptide triptofano/acido aspartico (WD) all'estremità C-terminale (Li and Roberts, 2001): la presenza di questo dominio è stata riscontrata in molteplici proteine bersaglio del CDL4a (Angers et al., 2006; He et al., 2006; Higa et al., 2006; Jin et al., 2006) (Figura 15).

La proteina DDB1 è altamente conservata dai lieviti fino ai mammiferi e la sua funzione risulta essere essenziale nei mammiferi e in *Drosophila* (Cang et al., 2006; Takata et al., 2004). Chang et al., (2006) hanno riportato come topi deleti per la proteina DDB1, siano soggetti a letalità embrionale, degenerazione neuronale e emorragie cerebrali: la morte cellulare risulta essere preceduta da un accumulo aberrante dei regolatori del ciclo cellulare, nonché da un incremento dell'instabilità genomica (Cang et al., 2006). Analogamente, anche studi condotti su topi deleti per la Cul4a, mettono in luce una letalità embrionale intorno al giorno 7.5 dal concepimento (Li et al., 2002), inoltre studi di inattivazione genica della cul4a, rilevano un sostanziale incremento della re-replicazione del DNA, causato da un accumulo del fattore di replicazione CDT1 (Zhong et al., 2003): il complesso CDL4a risulta implicato nell'induzione dei meccanismi che individuano il danno, attivano il riparo e impediscono la replicazione del DNA danneggiato interferendo quindi con la progressione del ciclo cellulare. Uno dei substrati identificati del complesso CDL4a, è infatti proprio il fattore CDT1, subunità del complesso di pre-replicazione, il suddetto fattore viene finemente regolato da eventi di ubiquitinazione dipendenti dal complesso CDL4a, sia durante la

progressione del ciclo per prevenire eventi di re-replicazione, sia in seguito al danno al DNA, in modo da evitare la replicazione del DNA lesionato (Higa et al., 2003; Nishitani et al., 2006).

La proteina PCNA risulta mediare l'ubiquitinazione e la successiva proteolisi di CDT1, in quanto è in grado di richiamare sulla cromatina il complesso CDL4a, che può così riconoscere e modificare post-traduzionalmente CDT1 (Jin et al., 2006; Arias and Walter, 2006).

Analogamente a quanto descritto, un recente studio condotto da Abbas et al., (2008), ha evidenziato come il complesso CDL4a sia responsabile dell'ubiquitinazione del fattore p21, in condizioni di irradiazione con basse dosi di UV. L'ubiquitinazione di p21 è dipendente da PCNA: la deplezione di PCNA abroga l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione di p21 CDL4a-dipendente (Abbas et al., 2008).

La progressione del ciclo cellulare viene quindi finemente regolata dall'attività di ubiquitinazione del complesso CDL4a, ulteriori esempi ne convalidano il ruolo descritto: CDL4a è in grado di reclutare i substrati Dacapo, l'inibitore della chinasi ciclina-dipendente (CDKI) presente in *Drosophila*, e il suo omologo in cellule animali: la proteina CDKI, p27^{Kip1}: l'ablazione dell'espressione della cul4a sia in *Drosophila* che in cellule umane determina un arresto del ciclo cellulare in G1, effetto che viene controbilanciato in seguito al silenziamento di Dacapo o di p27 (Higa et al., 2006).

Il complesso CDL4a è stato visto anche essere implicato nella regolazione indiretta del fattore trascrizionale p53. p53 risulta essere regolato dalla E3 ligasi monomeric Mdm2, studi recenti hanno però individuato un ruolo di regolazione della stabilità del suddetto fattore anche da parte della cul4a: studi di silenziamento del complesso CDL4a sono responsabili di una stabilizzazione di p53 (Banks et al., 2006), mentre l'overespressione della sola cul4a è sufficiente per determinare una de-regolazione di p53 stesso (Nag et al., 2004). Parallelamente Cang et al.,(2006) hanno verificato come in topi deleti per DDB1 ci sia un accumulo di p53 (Cang et al., 2006). Tutti questi dati attribuiscono al complesso CDL4a la capacità di incrementare e potenziare l'ubiquitinazione di p53 Mdm2-dipendente: la cul4a esercita un'attività di ubiquitinazione nei confronti di p53 che risulta diminuire in MEF Mdm2^{-/-} e viene ristabilita mediante reintroduzione di Mdm2 wild type (Banks et al., 2006).

Recenti studi hanno indicato come la ligasi CDL4a sia implicata nella regolazione delle modificazioni che avvengono negli istoni (Higa et al., 2006; Jia et al., 2005): l'alterazione della struttura della cromatina controlla temporalmente e

spazialmente l'espressione genica, la formazione dell'eterocromatina, la replicazione e il danno al DNA ed è controllata a sua volta dalle modificazioni post-traduzionali degli istoni (fosforilazioni, acetilazioni, metilazioni, ubiquitinazioni) (Martin and Zhang, 2005). Il complesso CDL4a tra i vari ruoli svolti, sembra essere anche implicato nella regolazione degli istoni: CDL4a interagisce con i componenti del complesso istone metiltrasferasi (WDR5 e RBBP5) specifico per l'istone H3 e ne regola la metilazione sul residuo K4 (Higa et al., 2006). In particolare CDL4a interagisce con H3K4 mono, di, trimetilato, ma non con l'istone H3 non modificato, esercitando tramite l'ubiquitinazione, un ruolo di regolatore negativo della metilazione di H3 (Higa et al., 2006).

Viceversa gli stessi autori hanno rivelato un ruolo di CDL4a come regolatore positivo della metilazione dell'istone H3 nei residui K9 e K27 (Higa et al., 2006). CDL4a interagisce con un gruppo di proteine che costituiscono la metiltrasferasi dell'istone H3 nei residui Lys9 e Lys27, Higa et al., (2006) hanno verificato come l'inattivazione di CDL4a abolisca la metilazione nei residui K9 e K27, evidenziando un ruolo di CDL4a nel controllo della metilazione (Higa et al., 2006).

Osley et al., (2006), hanno invece verificato come la monoubiquitinazione degli istoni H2A/H2B sia un prerequisito per la metilazione degli istoni H3/H4 (Osley et al., 2006), inoltre Wang et al., (2006) hanno messo in luce come DDB2 sia implicato nell'ubiquitinazione di H2A ed ancora come il complesso CDL4a attivo sia in grado di ubiquitinare H3 e H4: la modificazione post-traduzionale degli istoni H3 e H4 promuove i meccanismi di riparo del DNA (Wang et al., 2006). Tutti i dati descritti mettono in risalto un ulteriore ruolo dell'ubiquitinazione CDL4a-dipendente che risulta quindi essere diversificato dalla degradazione proteosoma-dipendente.

E3 di tipo U-Box

Le U-Box ligasi sono costituite da un dominio di 74 residui aminoacidici, strutturalmente simile al dominio di tipo RING (Cyr et al., 2002; Hatakeyama and Nakayama, 2003).

Inizialmente erano considerate delle proteine "ausiliarie" in quanto in grado di facilitare l'interazione tra l'E2 e l'E3, studi condotti successivamente hanno dimostrato la capacità di queste ligasi di poter interagire con l'E2 indipendentemente dalla presenza dell'E3. Il prototipo della famiglia è la proteina Ufd2, conservata dal lievito all'uomo

coinvolta nella formazione e nell'allungamento delle catene di ubiquitina (Cyr et al., 2002). Il membro maggiormente caratterizzato tra le U-box è la proteina CHIP responsabile del riconoscimento delle proteine non avvolte correttamente. CHIP agisce in concerto con le due chaperonine Hsp70 e Hsp90. Differenti substrati di CHIP sono noti e comprendono il recettore dei glucocorticoidi, il fattore trascrizionale E2A e la proteina tau associata alla sindrome di Alzheimer (Huynh et al., 2003; Cyr et al., 2002; Hatakeyama and Nakayama, 2003).

1.5.5 Ubiquitinazione di p73

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno identificato Itch come la HECT E3 ligasi responsabile della degradazione del fattore trascrizionale p73: un frammento della proteina TAp73 α , costituito dalla regione posta all'estremità C-terminale contenente il dominio ricco in proline (PY) è stato fuso con la GST ed è stato utilizzato come sonda in uno screening "phage display" (Cesareni et al., 1999; Castagnoli et al., 2001). I risultati ottenuti dallo screening hanno identificato la proteina Itch come interattore di p73. Successivamente Rossi et al., (2004) hanno verificato, attraverso saggi di ubiquitinazione condotti sia *in vitro* che *in vivo*, come l'E3 ligasi neo identificata fosse responsabile dell'ubiquitinazione di entrambe le isoforme (TA e ΔN) di p73. Inoltre Itch è in grado di poliubiquitinare anche l'altro membro della famiglia di p53: p63, anche in questo caso l'ubiquitinazione riguarda entrambe le isoforme di p63 sono ubiquitinate (Rossi et al., 2006). Viceversa, Itch non esercita alcun effetto su p53. Itch, infatti interagisce attraverso la sua regione centrale costituita dai domini WW con la porzione C-terminale dei membri della famiglia di p53, la suddetta regione è però assente in p53 (Rossi et al., 2005, 2006). L'ubiquitinazione che consegue al legame prevede la formazione di una catena di molecole di ubiquitina che viene riconosciuta dal proteosoma, il quale è a sua volta responsabile della degradazione delle due proteine p73 e p63 (Bernassola et al., 2004; Rossi et al., 2005, 2006) (Figura 17).

Recentemente è stata identificata una nuova proteina N4BP1 con funzione di regolatore negativo dell'attività catalitica di Itch. L'azione della nuova proteina N4BP1 si riflette con una riduzione dell'ubiquitinazione dei membri della famiglia di p53: p73 e p63 (Oberst et al., 2007).

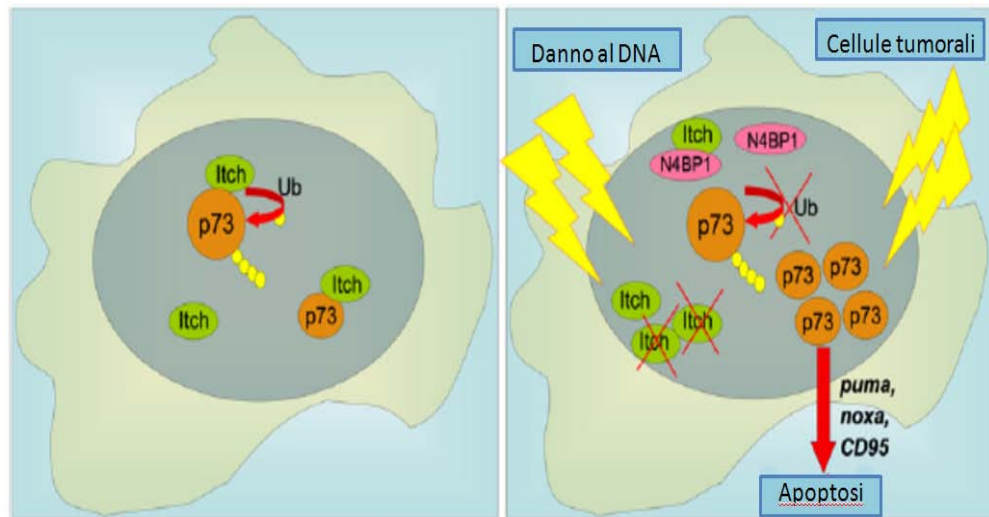


Figura17: La regolazione di p73 mediata da Itch induce apoptosi. In cellule in condizioni stazionarie i livelli cellulari di p73 sono tenuti bassi dall'attività di ubiquitinazione esercitata da Itch. In cellule tumorali in risposta a trattamento con agenti chemioterapici si ha l'induzione di p73 che può essere ascrivita 1) alla diminuzione dei livelli di espressione di Itch; 2) all'azione inibitoria esercitata da N4BP1 su Itch. L'attività di N4BP1 si riflette sulla riduzione della capacità di Itch di reclutare e ubiquitinare i suoi substrati. L'accumulo di p73 è responsabile dell'induzione trascrizionale di geni apoptotici (Bernassola et al., 2008).

L'isoforma $\Delta Np73$ risulta efficacemente degradata in risposta ad agenti che danneggiano il DNA, attraverso un meccanismo che prevede il coinvolgimento del proteosoma (Maisse et al., 2004). Le varianti TA, analogamente a p53, vengono invece stabilizzate in risposta al danno del DNA. I meccanismi responsabili di dell'accumulo di p73 in seguito a stress genotossico sono ancora poco chiari. Tuttavia un ruolo chiave sembra essere svolto dalla diminuzione dei livelli proteici di Itch che segue al trattamento di numerose linee cellulari tumorali con l'agente chemioterapico doxorubicina. In queste condizioni sperimentali Rossi et al., (2004) hanno anche verificato un incremento dell'induzione della morte apoptotica (Rossi et al., 2004). Un'alterata regolazione di Itch potrebbe determinare una variazione nel controllo della crescita, nel differenziamento e nell'induzione apoptotica ed essere responsabile in ultima analisi di trasformazioni maligne e di chemioresistenza.

Attraverso studi di screening condotti per identificare ulteriori interattori di p73, è stata identificata un'altra E3 appartenente alla famiglia delle HECT e denominata NEDL2. La porzione centrale dell'enzima contenente i domini WW interagisce con p73 attraverso un motivo ricco in prolina PY posto all'estremità C-terminale, della proteina; in questo caso però, a differenza di ciò che accade per Itch, il legame che media la reazione di ubiquitinazione di p73, non porta alla sua degradazione proteosoma-

dipendente, ma induce stabilizzazione del fattore trascrizionale ed un aumento della sua funzionalità (Miyazaki et al., 2003).

Data l'alta omologia tra i membri della famiglia di p53, era stato inizialmente ipotizzato che Mdm2, la E3 specifica per p53, potesse regolare anche l'ubiquitinazione di p73. Diversi studi hanno identificato i residui responsabili dell'interazione tra p53 e Mdm2 (F19, W23 e L26) e la loro conservazione all'interno degli altri membri della famiglia di p53, nonché il legame tra p73 e Mdm2 (Yang et al., 1998; Kaghad et al., 1997; Bottger et al., 1997; Kussie et al., 1996). Tuttavia, l'interazione tra p73 e Mdm2 non è finalizzata alla regolazione della stabilità di p73. Infatti, studi condotti in overespressione hanno piuttosto messo in luce un effetto stabilizzante di Mdm2 sui livelli proteici di p73; inoltre la regione contenente i residui di lisina di p53 che vengono modificati da Mdm2 è assente nella sequenza di p73 (Ongkeko et al., 1999; Zeng et al., 1999; Gu et al., 2000).

La stabilità proteica di p73 viene regolata anche attraverso meccanismi ubiquitina-indipendenti. Asher and Shaul (2005) hanno infatti descritto un meccanismo di regolazione comune sia a p53 che a p73 che ne determina la degradazione attraverso il proteosoma, ma non coinvolge reazioni di ubiquitinazione. L'NADH chinone riduttasi (NQO1) interagisce con p73 attraverso una reazione dipendente dal NADH; questo legame costituisce una forma di "protezione" di p73 dal riconoscimento e dalla successiva degradazione da parte del proteosoma. Inoltre un'alta concentrazione cellulare di NQO1 interagisce con la subunità 20S del proteosoma, impedendone così l'interazione con p73. L'assenza del legame NQO1/p73 rende p73 stesso maggiormente sensibile alla proteolisi proteosoma-dipendente. Infatti, studi condotti utilizzando il dicumarolo o altri inibitori dell'enzima NQO1, hanno indicato che tali composti inducono la degradazione di p73 (Asher et al., 2001; Asher and Shaul, 2005; Asher et al., 2005; Tsvetkov et al., 2005).

Un altro meccanismo di degradazione di p73 non dipendente dalla sua ubiquitinazione, viene esercitato dalla ligasi UFD2a contenente un dominio di tipo U box (Hosoda et al., 2005).

2.SCOPO DEL LAVORO

La proteina p73 appartiene ad una famiglia di fattori trascrizionali il cui prototipo è l'oncosoppressore p53. In maniera simile a p53, p73 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare, dell'apoptosi e della senescenza cellulare, funzioni biologiche attraverso le quali contribuisce a prevenire la tumorigenesi e la chemioresistenza.

Dalla letteratura è noto come p73 venga indotto in seguito a danni al DNA e a stress genotossici, causando conseguentemente un aumento della risposta apoptotica e un arresto del ciclo cellulare (Zhu et al., 1998; Lee et al., 1999; Yu et al., 1999; Flores et al., 2002; Flores et al., 2005). Risulta quindi interessante indagare i meccanismi di regolazione di p73 e come questi possano essere modulati in risposta a danni al DNA allo scopo di sviluppare strategie antitumorali.

Nell'ottica di approfondimento della regolazione del fattore trascrizionale p73, nel mio lavoro di tesi sono stati presi in esame i meccanismi di regolazione post-traduzionale, in particolare le modificazioni ubiquitina-dipendenti responsabili della modulazione della stabilità e dell'attività trascrizionale di p73.

Il pathway di ubiquitinazione, ed in particolare le E3 ubiquitina ligasi che determinano la specificità di questa modificazione covalente, hanno un ruolo fondamentale nel controllo del ciclo cellulare, della risposta al danno al DNA e dell'apoptosi. Lo studio della regolazione delle E3 ligasi e dei loro substrati costituisce quindi un importante obiettivo nella comprensione delle basi molecolari della tumorigenesi; numerosi studi hanno infatti evidenziato come gli enzimi E3 svolgano un ruolo importante nel cancro: un'alterata regolazione dei substrati coinvolti nella modulazione di tali processi biologici è stata infatti correlata con lo sviluppo della cancerogenesi. Inoltre lo studio accurato dei meccanismi molecolari preposti all'ubiquitinazione di oncosoppressori come p73, nonché l'identificazione di molecole in grado di inibire i componenti del sistema di ubiquitinazione, potrebbe rivelarsi di fondamentale interesse per strategie mirate alle terapie contro il cancro.

Precedentemente nel nostro laboratorio, è stata identificata l' E3 ubiquitina ligasi Itch, come l'enzima principalmente responsabile della degradazione ubiquitina-dipendente di p73 (Rossi et al., 2005). E' stato inoltre evidenziato come in seguito al trattamento con differenti agenti chemioterapici, i livelli di Itch diminuiscono

parallelamente ad un incremento dei livelli di p73. Risulta quindi evidente come comprendere nel dettaglio la regolazione di Itch possa fornire le basi per una maggiore comprensione dei meccanismi di tumorigenesi e risposta chemioterapia in cui è coinvolto p73.

Inoltre, nel nostro laboratorio è stata dimostrata l'interazione molecolare tra Itch e la proteina N4BP1. Il suddetto legame, porta alla riduzione dei livelli di ubiquitinazione e conseguente degradazione mediata dal proteosoma di p73. I nostri dati preliminari suggeriscono che N4BP1 eserciti un'azione inibitoria nei confronti della capacità di Itch di catalizzare l'ubiquitinazione di p73. Tuttavia i meccanismi molecolari alla base dell'effetto inibitorio esercitato da N4BP1 e le sue conseguenze biologiche rimangono ancora scarsamente caratterizzati.

Lo scopo della prima parte del lavoro è stato proprio quello di determinare la rilevanza funzionale dell'interazione tra N4BP1 e Itch, e il conseguente effetto sui suoi substrati. Infatti, come sottolineato in precedenza, l'identificazione di regolatori della ligasi Itch risulta di estremo interesse per l'eventuale sviluppo di strategie antitumorali.

La seconda parte del mio progetto di dottorato ha riguardato la caratterizzazione di un altro meccanismo di regolazione ubiquitina-dipendente di p73, di cui è responsabile una E3 ubiquitina ligasi del tipo RING-finger, il complesso multi-proteico Cul4a-dipendente (CDL4a).

Una subunità di questa E3 ubiquitina ligasi è stata descritta interagire funzionalmente con p53 (Nag et al., 2004). Poichè i diversi membri della famiglia di p53 condividono un elevato grado di identità aminoacidica e di similitudini strutturali, abbiamo testato l'ipotesi dell'esistenza di una possibile interazione tra p73 ed il complesso CDL4a.

Inizialmente abbiamo quindi indagato l'aspetto biochimico dell'interazione tra p73 e la E3 CDL4a al fine di comprendere i meccanismi alla base dell'interazione. L'identificazione di un'altra E3 ubiquitina ligasi di p73 risulta essere di notevole interesse in quanto il suo studio, permette di ottenere una migliore comprensione dei meccanismi di regolazione di p73 e di conseguenza una più ampia conoscenza delle funzioni biologiche dell'oncosoppressore da un lato e dell'eventuale sviluppo di tecniche chemioterapiche dall'altro.

A questo scopo abbiamo condotto degli studi concentrati sull'effetto esercitato dalla ligasi su p73 e sulle funzioni cellulari da esso regolate.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari, plasmidi e condizioni di trasfezione:

Nello studio riportato sono state utilizzate le seguenti linee cellulari: carcinoma umano del rene HEK293T; carcinoma umano del polmone H1299; carcinoma umano del colon HCT-116(3); carcinoma umano della mammella BT-20; fibroblasti embrionali murini MEF N4BP1 KO vs WT (gentilmente forniteci dal Dr. Michael R. Kuehn); fibroblasti embrionali murini MEF CUL4a KO vs WT (gentilmente forniteci dal Dr. P. Zhou); fibroblasti embrionali murini MEF DDB1 F/F (gentilmente forniteci dal Dr. P. Zhou).

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state mantenute nel “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*” (DMEM) complementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e con 100 µg/ml di penicillina e 100 µg/ml streptomycin. Sono state fatte crescere a 37°C in un’atmosfera umidificata con una concentrazione di CO₂ pari al 5%.

Le cellule sono state trasfettate utilizzando il metodo del calcio fosfato e i seguenti reagenti: la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) o l’Effectene (Qiagen) secondo la modalità descritta dalla casa produttrice.

I plasmidi utilizzati nelle trasfezioni sono i seguenti: TAp73α-HA; TAp73γ-HA; TAp73α-flag; TAp73α-myc; TAp73(DBD)-HA; TAp73(CT)-HA; p53-HA; (De Laurenzi et al., 1998), N4BP1-V5; c-Jun; cul4a-myc; DDB1-flag; DDB1; ub-HA-myc; Itch-myc tutti espressi in vettori pCDNA 3.1 (Invitrogen).

3.2 Analisi di immunoblotting e immunoprecipitazioni:

Per preparare gli estratti cellulari da utilizzare nelle analisi per immunoblotting, le cellule sono state prima raccolte attraverso tripsinizzazione e lavate con il PBS. In seguito gli estratti cellulari sono stati lisati nel tampone di lisi Triton (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA 1 pH 8, 0.1% Triton), con l’aggiunta degli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi. Le proteine dopo essere state quantificate attraverso l’utilizzo del Bradford, sono state separate mediante l’SDS/PAGE e

successivamente trasferite su filtri PVDF. In seguito le membrane sono state bloccate con PBS-Tween (Phosphate-buffered saline and 0.1%Tween-20) con il 5% di latte in polvere per 1h e poi incubate con l'anticorpo primario specifico per 2h a temperatura ambiente. Dopo i lavaggi in PBS-Tween, le membrane sono state incubate per 1h a temperatura ambiente utilizzando il corrispondente anticorpo secondario. La rilevazione delle proteine è stata effettuata mediante l'ECL Western Blot Chemiluminescence Reagent.

Negli studi sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: mouse monoclonal anti-Itch (BD Biosciences Pharmingen), mouse monoclonal anti-Myc (Cell Signaling Technology Inc.), mouse monoclonal anti-p21 (Santa Cruz), mouse monoclonal anti--actin (Sigma), rabbit polyclonal anti-Flag (Sigma), and mouse monoclonal anti-ubiquitin (Zymed), rabbit polyclonal anti-N4BP1 (gentilmente fornito dal Dr. R. Kuehn), mouse monoclonal anti-p73 (Abcam), mouse monoclonal anti-p53 (clone DO-1; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-HA (clone H11, Covance); rabbit polyclonal anti-GFP (Clontech); mouse monoclonal anti-Flag (clone M2; Sigma); goat polyclonal anti-GST (Promega); mouse polyclonal anti-JunB (clone N-17; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-V5 (Invitrogen); mouse monoclonal anti-laminaA/C (Santa Cruz); goat polyclonal cul4a (Santa Cruz); mouse monoclonal c-Jun (BD Biosciences Pharmingen); rabbit polyclonal tubulin (Santa Cruz); rabbit polyclonal p73 SAM (Sayan et., 2005); goat polyclonal DDB1 (Novus Biologicals); mouse monoclonal p27 (BD Biosciences Pharmingen); rabbit polyclonal Puma (Cell Signaling).

Per le immunoprecipitazioni, i lisati cellulari sono stati incubati con la resina A/G sepharosio (Roche) per 2h a 4°C, per eliminare eventuali interazioni aspecifiche; in seguito gli estratti sono stati immunoprecipitati con gli specifici anticorpi che a loro volta erano stati precedentemente pre-adsorbiti alla resina A/G sepharosio. Gli immunocomplessi sono stati lavati nel tampone di lisi Triton ed in seguito eluiti attraverso bollitura con il tampone di caricamento Laemmli.

3.3 Determinazione dell'emivita proteica:

L'emivita delle diverse proteine esaminate è stato misurato attraverso il blocco della sintesi proteica mediante l'uso della cicloesimide (CHX, Sigma).

Le cellule HEK293T sono state trasfettate con i fattori trascrizionali: TAp73 α -HA; p53-HA e c-jun da soli o in presenza di dosi crescenti delle diverse proteine: N4BP1, oppure Itch, oppure Cul4a, o infine DDB1. 24h dopo la trasfezione è stata aggiunta al mezzo di coltura la cicloesimide ad una concentrazione finale di 80 g/ml. Le cellule sono state poi raccolte ai diversi tempi indicati ed una uguale concentrazione proteica di lisati è stata sottoposta a SDS-PAGE ed analizzata attraverso un immunoblot (IB).

3.4 Studi di si-RNA:

Le cellule HCT116 sono state trasfettate con gli oligo di RNA a doppio filamento per silenziare l'espressione di N4BP1 sequenza target: CTGAATATTTCTAGAGATGAA (Qiagen: N4BP1_3 HP), o di DDB1 sequenza target: AAGGACCTGCTGTTTATCTTG (Qiagen: DDB1bis), o della Lamina A/C (Qiagen: LMNA_10_HP) utilizzata come controllo. Le cellule sono state trasfettate utilizzando l'Oligofectamine (Invitrogen) con il duplex di si-RNA ad una concentrazione finale di 100nM. Dopo 24h dalla trasfezione le cellule sono state raccolte, lisate, normalizzate, sottoposte a SDS-PAGE e infine analizzate attraverso immunoblotting.

3.5 Saggio di luciferasi:

Per la determinazione dell'attività trascrizionale dei membri della famiglia di p53, le cellule H1299, o le MEF N4BP1 WT vs KO, sono state piastrate in duplicato nelle piastre da 12 pozzetti e sono state cotrasfettate con i plasmidi TAp73 α , TAp73 γ , p53, con il vettore pRL-TK codificante per il cDNA della Renilla, e con i plasmidi Gadd45min-luc codificante per il cDNA di Gadd45, o p21min-luc codificante per il cDNA di p21. Per il saggio finalizzato alla misurazione dell'attività trascrizionale di c-jun, le cellule Hela sono state cotrasfettate con la galattosidasi-4(GAL4)-c-jun (GAL4-C-jun) e con il plasmide reporter della luciferasi-GAL4 (GAL4-Luc) (Stratagene). Per il saggio finalizzato alla determinazione dell'attività trascrizionale di TAp73a dopo silenziamento di DDB1, le cellule HCT 116 (3) sono state silenziate come

precedentemente descritto, dopo 24h dal silenziamento sono state trasfettate con il plasmide TAp73 α , con il vettore pRL-TK codificante per il cDNA della Renilla, e con il plasmide Gadd45min-luc codificante per il cDNA di Gadd45.

L'attività della luciferasi è stata misurata 24h dopo la trasfezione utilizzando il dual reporter assay system (Promega) ed è stata normalizzata attraverso la misurazione dell'attività luciferasica della Renilla secondo le modalità descritte dalla casa produttrice.

3.6 Saggi di legame *in vitro*:

Per identificare le interazioni dirette tra i substrati, le diverse proteine in questione sono state purificate come segue: le proteine ricombinanti taggate con la GST, sono state purificate attraverso la resina di glutatione (GE Healthcare), la proteina p73-His è stata purificata mediante la resina al Nickel (NiNTa, Qiagen), il complesso CDL4a (ROC1:Cul4a:DDB1) è stato purificato da cellule precedentemente infettate con il baculovirus esprime il complesso stesso, le proteine N4BP1-V5, p73-HA e la cul4a-myc sono state prodotte *in vitro* attraverso il sistema T7 dei reticolociti di coniglio (Promega) secondo le modalità descritte dal protocollo.

Le reazioni di legame sono state condotte utilizzando 1-10 μ g delle proteine di fusione con la GST, precedentemente adsorbite alla resina di sefarosio oppure 1-10 μ g del complesso CDL4a purificato in presenza di 3-15 μ l delle proteine traslate *in vitro*. La reazione è stata fatta avvenire in un tampone di legame (20mM TrisHCl pH7.5; 200mM NaCl; 0.1% Triton X-100), ed è stata incubata su di un agitatore a 4°C per 1h. Dopo 5 lavaggi nel buffer di legame, i complessi formati sono stati risolti mediante SDS-PAGE e visualizzati attraverso un immunoblotting.

3.7 Saggio di competizione *in vitro*:

10 μ g della proteina di fusione Itch-GST sono stati messi in presenza delle proteine N4BP1-V5, e della proteina p73-HA entrambe purificate attraverso l'utilizzo del sistema dei reticolociti di coniglio (Promega). La reazione è stata condotta nel tampone

di legame (20mM TrisHCl pH7.5; 200mM NaCl; 0.1% Triton X-100), ed è stata incubata su di un agitatore a 4°C per 1h. Dopo 5 lavaggi nel buffer di legame, i complessi formati sono stati risolti mediante SDS-PAGE e visualizzati attraverso un immunoblotting.

3.8 Saggio di ubiquitinazione *in vivo*:

Le cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con i vettori indicati per 24h. Le cellule sono state trattate con l'inibitore del proteosoma MG132 (Calbiochem) ad una concentrazione finale di 40µM per 1h prima di essere raccolte. La lisi è stata condotta in tampone denaturante RIPA (50mM TrisHCl pH7.5; 150mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0.1% SDS; 0.5% sodio deossicolato). Le immunoprecipitazioni sono state risolte come precedentemente descritto e le forme poliubiquitinate sono state evidenziate attraverso un IB utilizzando l'anticorpo anti-HA.

3.9 Saggio di ubiquitinazione *in vitro*:

La reazione di ubiquitinazione *in vitro* è stata effettuata utilizzando la proteina cul4a-myc immunopurificata dalle cellule HEK293T precedentemente trasfettate transientemente con il suddetto vettore. Gli immunocomplessi cul4a-myc sono stati lavati due volte con il tampone equilibrante (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Triton and 10% glycerol). In alternativa sono stati utilizzati 0.5µg del complesso CDL4a purificato da cellule infettate con il baculovirus. Per il saggio di ubiquitinazione ogni campione costituito da 30 ng of E1, 0.5 mg of UbcH7 and 5 g di ubiquitina è stato aggiunto alla miscela della reazione di ubiquitinazione (2.5 mM Tris-HCl, 0.7 mM DTT, 4 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM ubiquitin aldeide) e incubato a 30°C ai tempi indicati. I campioni sono poi stati bolliti nel tampone di caricamento e sono stati risolti attraverso SDS/PAGE seguito da immunoblotting diretto contro p73.

3.10 Infezione retrovirale :

Le cellule BT-20 sono state infettate con il vettore lentivirale contenente il costrutto shRNA specifico per DDB1 (SHVRSC, Sigma) ad una MOI pari a 2 o.n. nel mezzo DMEM complementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e con 100 µg/ml di penicillina e 100 µg/ml streptomina con l'aggiunta di polibrene ad una concentrazione finale di 8 µg/ml. Dopo 24h dall'infezione le cellule sono state selezionate in puromicina ad una concentrazione finale pari a 2µg/µl.

Le cellule MEF DDB1 F/F sono state infettate con il vettore adenovirale contenente la ricombinasi Cre per 1h a 37°C nel mezzo DMEM complementato con lo 0.2% di FBS. Le cellule sono state raccolte a 3 giorni dall'infezione e sono state sottoposte ad analisi per IB come precedentemente descritto.

3.11 Reazione di RT-PCR semiquantitativa e di real-time PCR (qPCR):

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule mediante l'utilizzo dell'RNeasy Kit (Qiagen) secondo le modalità descritte dal protocollo. L'RNA è stato convertito in cDNA attraverso la retrotrascrizione utilizzando la SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Mediante la PCR sono stati amplificati i seguenti frammenti di DNA: human TAp73 F 5'-CCACGTTTGAGCACCTCTGG-3' e human TAp73 R 5'-CTGCTCAGCAGATTGAACTGG-3'; human Puma F 5'-CTGTGAATCCTGTGCTCTGC e human Puma R 5'-AATGAATGCCAGTGGTCACA-3'; mouse p21 F 5'-TGTTCCGCACAGGAGCAAAGT-3' e mouse p21 R 5'-CGTCTCCGTGACGAAGTCAA-3'; mouse Bax F 5'-GTGTCTCCGGCGAATTGG-3' e mouse Bax R 5'-CCCAGTTGAAGTTGCCATCA-3'; mouse Gadd45 F 5'-CAGAGCAGAAGACCGAAAGGA-3' e mouse Gadd45 R 5'-GCAGGCACAGTACCACGTTATC-3'; mouse c-Jun F 5'-GCAGAGGGAAGCGCATGA-3' e mouse c-Jun R 5'-TGAGCATGTTGGCCGTGGAT-3'; L'amplificazione dell'actina è stata effettuata utilizzando dei primer commerciali (Stratagene, human #302010; mouse #302110) secondo le istruzioni fornite dal protocollo. Le reazioni sono state condotte con il

seguinte programma: 95°C 3min, seguiti da 30 cicli: 94°C 35sec; 56°C 35sec; 72°C 40 sec, seguiti da 5min a 72°C.

Nelle qPCR, la mix di reazione utilizzata è la Platinum SYBR Green qPCR SuperMix without ROX (Invitrogen) in un volume finale di 25 µl. Il cDNA totale è stato successivamente amplificato con le seguenti coppie di primers: mouse p21 F 5'-TGTTCCGCACAGGAGCAAAGT-3' e mouse p21 R 5'-CGTCTCCGTGACGAAGTCAA-3'; mouse c-Jun F 5'-GCAGAGGGAAGCGCATGA-3' e mouse c-Jun R 5'-TGAGCATGTTGGCCGTGGAT-3'; La reazione stata condotta utilizzando il seguente programma di PCR: 95°C per 3 min seguiti da 40 cicli a 94°C per 15s e 59°C for 1min.

4. RISULTATI

4.1 Premessa ai risultati

Nel mio lavoro di tesi mi sono preposta di studiare i meccanismi di regolazione ubiquitina-dipendente di p73. In particolare ho focalizzato la mia attenzione sull'isoforma trascrizionalmente attiva TAp73.

Studi condotti precedentemente nel nostro laboratorio hanno portato all'identificazione di Itch come una delle E3 responsabili dell'ubiquitinazione di p73 e della sua successiva degradazione proteolitica operata dal proteosoma (Rossi et al., 2005).

Dal momento che p73 svolge un ruolo importante come soppressore tumorale e come regolatore della chemiosensibilità, la regolazione fisiologica dei suoi livelli cellulari deve essere finemente modulata, allo scopo di prevenire fenomeni di trasformazione neoplastica e di resistenza alla terapia farmacologica dei tumori. In questa ottica risulta interessante identificare e studiare i meccanismi di regolazione della sua principale E3 ligasi, e monitorare gli effetti secondari sui suoi substrati, in particolare su p73.

A questo scopo, nel nostro laboratorio sono stati condotti degli studi preliminari, che hanno portato all'identificazione di un nuovo interattore molecolare di Itch denominato "Nedd4 Binding Protein1" (N4BP1). La proteina N4BP1 è stata inizialmente identificata come un substrato ed un interattore di Nedd4 attraverso un two-hybrid screen (Murillas et al., 2002). Data l'alta omologia strutturale osservata tra i vari membri della famiglia delle E3 di tipo HECT, i nostri studi preliminari sono stati indirizzati a verificare un'eventuale interazione tra Itch e N4BP1. Il legame osservato tra le suddette proteine è diretto, e determina un'inibizione dell'attività di ubiquitinazione esercitata da Itch su numerosi suoi substrati (Oberst et al., 2007). In particolare, abbiamo osservato che N4BP1 inibisce la capacità di Itch di poliubiquitinare vari membri della famiglia di p53 (TAp73 α , TAp63 α , Δ Np73 α e Δ Np63 α), e c-Jun. Al contrario non ha effetto su p53. Questo risultato conferma la specificità d'azione di N4BP1 nei confronti della ligasi Itch e non delle altre E3 ubiquitina ligasi: la stabilità di p53 è infatti regolata dalla E3 ligasi di tipo RING: Mdm2.

Dato il ruolo fondamentale di Itch, l'identificazione di un potenziale inibitore della sua attività ligasica ci ha portato ad approfondire ulteriormente la funzione e i meccanismi di azione di N4BP1.

4.2 La proteina N4BP1 regola la stabilità dei substrati di Itch.

4.2.1 L'assenza di N4BP1 induce i livelli proteici di p73

Per confermare il ruolo inibitorio di N4BP1 nei confronti di Itch, e per analizzare il suo ruolo fisiologico nella regolazione dei substrati di Itch, abbiamo utilizzato la tecnica dell'RNAi, per ottenere il silenziamento genico di N4BP1 in cellule di carcinoma umano del colon HCT116. In queste condizioni, abbiamo quindi misurato i livelli proteici endogeni di TAp73 e di altri substrati noti di Itch, come c-jun e junB. In particolare le cellule sono state trasfettate con un oligo di RNA a doppio filamento complementare al messaggero codificante per la proteina N4BP1. L'appaiamento tra l'oligo e il corrispondente messaggero serve da segnale per la successiva degradazione del messaggero stesso (Elbashir et al., 2001; Caplen et al., 2001). L'effetto ultimo della tecnica utilizzata determina il silenziamento della proteina N4BP1. La figura 1 mostra i livelli proteici endogeni di p73 c-jun e junB monitorati attraverso la tecnica di immunoblotting (IB). Tutti i substrati di Itch subiscono una riduzione dei livelli di espressione proteica in assenza di N4BP1. Come controllo negativo abbiamo utilizzato p53 che non presentando il dominio PY di interazione con Itch, non è un substrato di Itch. Dalla figura 18 si può notare come i suoi livelli di espressione proteica siano paragonabili tra le cellule che hanno subito il silenziamento di N4BP1 e le cellule di controllo. L'efficienza dell'RNAi è stata monitorata attraverso l'esame delle cellule di controllo, che sono state trasfettate con l'oligo specifico per il messaggero della lamina A/C. Come si evidenzia dalla figura 18, i livelli proteici della lamina A/C nelle cellule di controllo sono ridotti rispetto ai corrispondenti livelli nelle cellule interferite con l'oligo specifico per N4BP1.

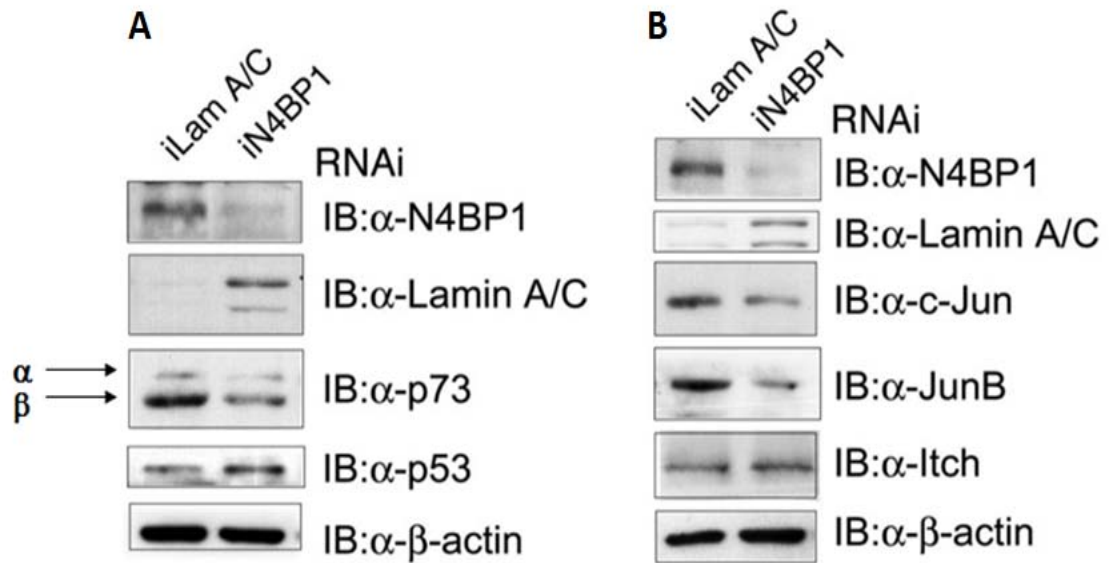


Figura 18: Il silenziamento di N4BP1 endogeno determina una riduzione dei livelli proteici dei substrati di Itch. (A-B) Le cellule HCT 116 (3) sono state trasfettate con l'oligo per la Lamina A/C o con l'oligo per N4BP1 (N4BP1_3 HP). Dopo 48 ore le cellule sono state raccolte, lisate e analizzate tramite IB usando anticorpi anti-p73 e anti-p53 (A), e anti-c-Jun e anti-JunB (B). Gli IB anti-N4BP1, anti-Lamina A/C e anti-actina sono stati utilizzati come controlli di trasfezione, silenziamento e di caricamento.

Ad ulteriore conferma dei dati ottenuti sulle cellule umane, sono stati condotti degli esperimenti utilizzando MEFs knock out per N4BP1 ($N4BP1^{-/-}$). Gli estratti cellulari ottenuti da MEFs wild-type ($N4BP1^{+/+}$) e $N4BP1^{-/-}$ sono stati analizzati mediante IB, utilizzando l'anticorpo diretto contro la proteina p73. La figura 19 mostra una riduzione dei livelli proteici del fattore trascrizionale nelle cellule $N4BP1^{-/-}$ rispetto alle corrispondenti cellule $N4BP1^{+/+}$. Dall'analisi degli stessi lisati cellulari si evince anche che i livelli della proteina p53, usato come controllo negativo, non subiscono alcuna variazione nelle cellule deplete per N4BP1.

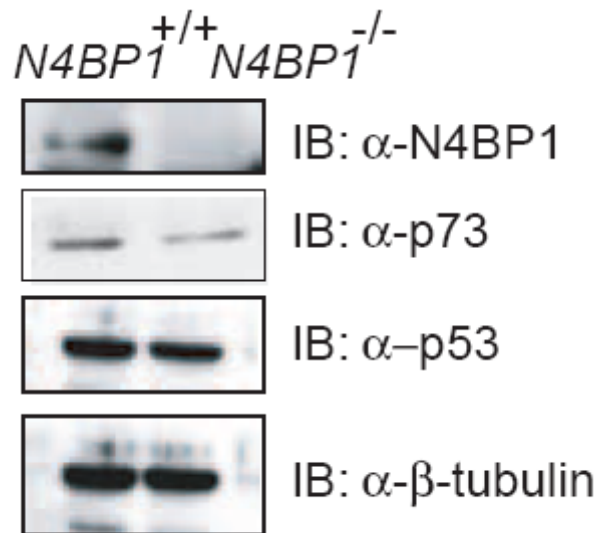


Figura 19: Il knockdown genetico di N4BP1 diminuisce i livelli proteici di p73. Gli estratti cellulari ottenuti dalle MEFs *N4BP1*^{+/+} e *N4BP1*^{-/-} sono stati esaminati attraverso IB utilizzando gli anticorpi anti-p73 e anti-p53. Gli IB utilizzando anti-N4BP1 e anti-tubulina servono rispettivamente come controllo del sistema cellulare utilizzato e come controllo del caricamento.

Il fattore trascrizionale c-jun, viene indotto sia a livello trascrizionale che post-traduzionale in seguito a danno al DNA, in particolare quello prodotto dalle radiazioni UV (Osborn and Chambers 1996; Musti et al., 1997). Le MEF *N4BP1*^{+/+} e *N4BP1*^{-/-} sono state sottoposte ad un trattamento con radiazioni UV e quindi lasciate in coltura per 4, 8 e 24 ore. In seguito al trattamento le cellule sono state lisate e sottoposte ad IB per c-jun. La figura 20 mette in luce che nonostante c-jun venga indotto in risposta alle radiazioni UV in entrambe le linee cellulari, l'incremento dei suoi livelli risulta inferiore nelle cellule in cui N4BP1 è stato depleto, rispetto alla stabilizzazione osservato in cellule in cui *N4BP1*^{+/+}. Eseguendo un'analisi quantitativa dei livelli di induzione, si denota infatti un incremento dell'espressione di c-jun di 7.7 volte nelle MEF *N4BP1*^{+/+}, valore che è drasticamente ridotto a 1.4 volte nelle MEF *N4BP1*^{-/-}.

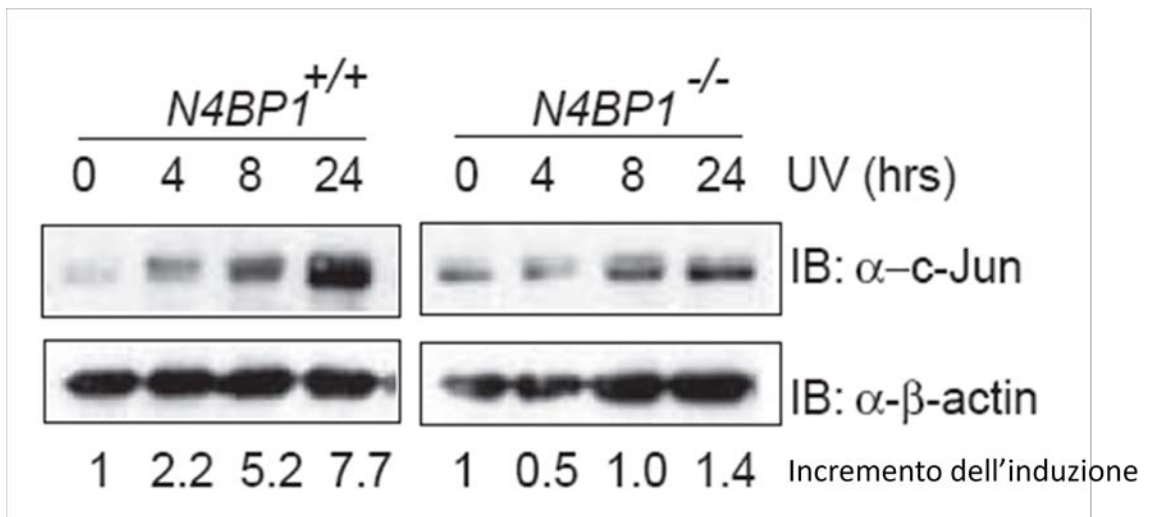


Figura 20: Il knockdown genetico di N4BP1 diminuisce i livelli proteici di c-Jun. Le MEF *N4BP1*^{+/+} e *N4BP1*^{-/-} sono state trattate con gli UV (60 J/m²) e raccolte ai diversi tempi dall'irraggiamento: 0, 4, 8, 24 ore di irradiazione. Gli estratti sono stati esaminati per IB tramite l'uso di un anticorpo anti-c-Jun. Il controllo di caricamento è stato monitorato con un anticorpo anti-actina.

4.2.2 L'overespressione di N4BP1 aumenta la stabilità di p73

Verificato un ruolo indiretto di N4BP1 nel regolare la stabilità dei substrati di Itch, ci siamo preposti di indagare se N4BP1 potesse influenzare l'emivita dei suddetti substrati. A questo scopo, cellule umane 293T sono state trasfettate con un cDNA codificante per TAp73α-HA in presenza o meno di N4BP1-V5. Le stesse cellule hanno poi subito un trattamento con la cicloesimide (CHX), un inibitore della sintesi proteica. La figura 21 mostra che l'emivita di p73 viene prolungata in presenza di N4BP1 (figura 21A).

Analogamente è stato condotto lo stesso esperimento monitorando un altro substrato di Itch, c-jun. Come mostrato in figura 21B, analogamente a p73, l'espressione di N4BP1 determina un incremento dell'emivita di c-jun. Come controllo della specificità di azione svolta da N4BP1 nei confronti dei substrati di Itch, abbiamo misurato l'emivita di p53 in seguito alla sua co-espressione con N4BP1. In queste condizioni, non abbiamo osservato alcuna variazione dell'emivita di p53, dopo il blocco della sintesi proteica, rispetto alle cellule che sono state trasfettate solamente con p53-HA (figura 21C). Nei grafici riportati nella figura 21, viene schematizzato la percentuale di decadimento delle tre diverse proteine in funzione del tempo, misurata in assenza o in presenza di N4BP1.

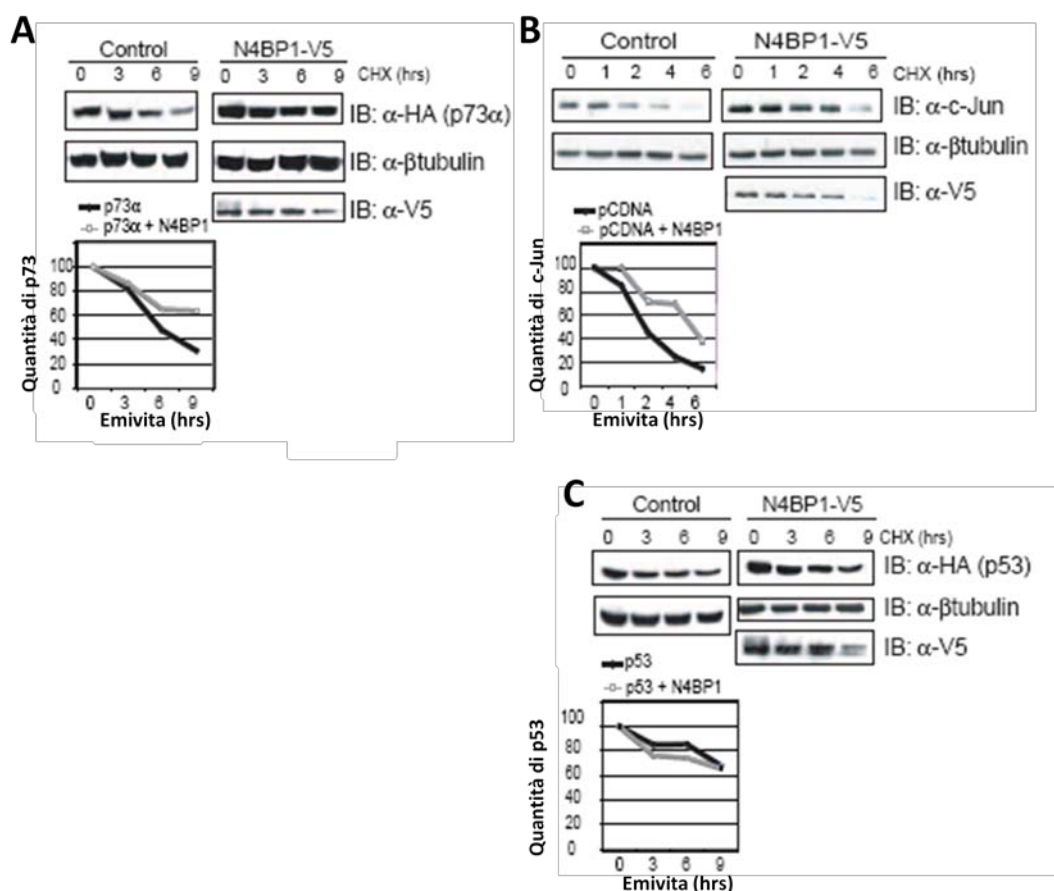


Figura 21: N4BP1 prolunga l'emivita dei substrati di Itch. Le cellule HEK 293T sono state trasfettate con i vettori di espressione per TAp73-HA (A), o con il vettore vuoto pCDNA (B), o con il vettore p53-HA (C), da solo o in cotrasfezione con il vettore N4BP1-V5. Ventiquattro ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate con la cicloesimide (CHX, 80 µg/ml) e sono state raccolte ai diversi tempi dall'inizio del trattamento. Gli estratti cellulari sono stati esaminati tramite IB utilizzando gli anticorpi anti-HA e anti-c-Jun. Le membrane sono state incubate anche con l'anticorpo anti-V5 per controllare l'espressione di N4BP1. Il grafico con l'emivita di p73, c-Jun e p53 è stato generato mediante densitometria e normalizzazione dei livelli di p73 con la tubulina.

4.2.3 N4BP1 regola l'attività trascrizionale di p73 e di c-Jun

Gli esperimenti mostrati fino ad ora hanno messo in luce un effetto di N4BP1 nel potenziare la stabilità di p73 e più in generale dei substrati di Itch. Partendo da questi risultati ci siamo preposti di verificare se la capacità di N4BP1 di stabilizzare p73 potesse influenzare anche la sua funzione trascrizionale. A questo scopo, abbiamo condotto dei saggi reporter di luciferasi utilizzando le cellule H1299 di carcinoma umano del polmone, in cui p53 è mutato. Le cellule sono state co-trasfettate con un costrutto codificante la proteina TAp73α e con il plasmide reporter Gadd45-RE-Luc, in

assenza o in presenza di N4BP1. Il reporter Gadd45-RE-Luc contiene l'RE a p53 localizzato nel promotore del gene codificante per *GADD45*, noto gene bersaglio delle proteine appartenenti alla famiglia di p53. I grafici riportati in figura 22A mostrano come la capacità di TAp73 α di transattivare il promotore di *GADD45* venga notevolmente incrementata attraverso l'overespressione della proteina N4BP1.

Sono stati inoltre condotti dei saggi di luciferasi in cellule Hela. Per monitorare l'attività trascrizionale di c-jun, le cellule sono state co-trasfettate con il vettore codificante per la proteina di fusione costituita dal dominio di attivazione di c-Jun fuso con il dominio di legame al DNA della galattosidasi-4 (GAL4-c-Jun) e il vettore reporter costituito da 5 ripetizioni in tandem dei siti di legame della galattosidasi che controllano l'espressione del gene della luciferasi (GAL4-Luc). Il grafico in figura 22B mostra l'andamento dell'attività trascrizionale di c-jun, in assenza ed in presenza di N4BP1. Analogamente ai risultati ottenuti per p73, la trascrizione c-jun dipendente, subisce un incremento in presenza di N4BP1. Come controllo della specificità di azione della proteina N4BP1, sono stati condotti analoghi saggi di luciferasi anche per un'altra isoforma di p73, TAp73 γ . Questa isoforma si origina attraverso un evento di splicing alternativo, in seguito al quale viene generata una proteina che perde la porzione carbossi-terminale in cui è presente il motivo PY, responsabile dell'interazione con Itch. Come atteso, l'attività trascrizionale dell'isoforma TAp73 γ , non viene significativamente influenzata dall'overespressione di N4BP1 (figura 22C). Analoghi risultati si possono riscontrare anche dall'esame del grafico della figura 22D, in cui viene misurata la capacità di p53 di transattivare il promotore del gene *GADD45*.

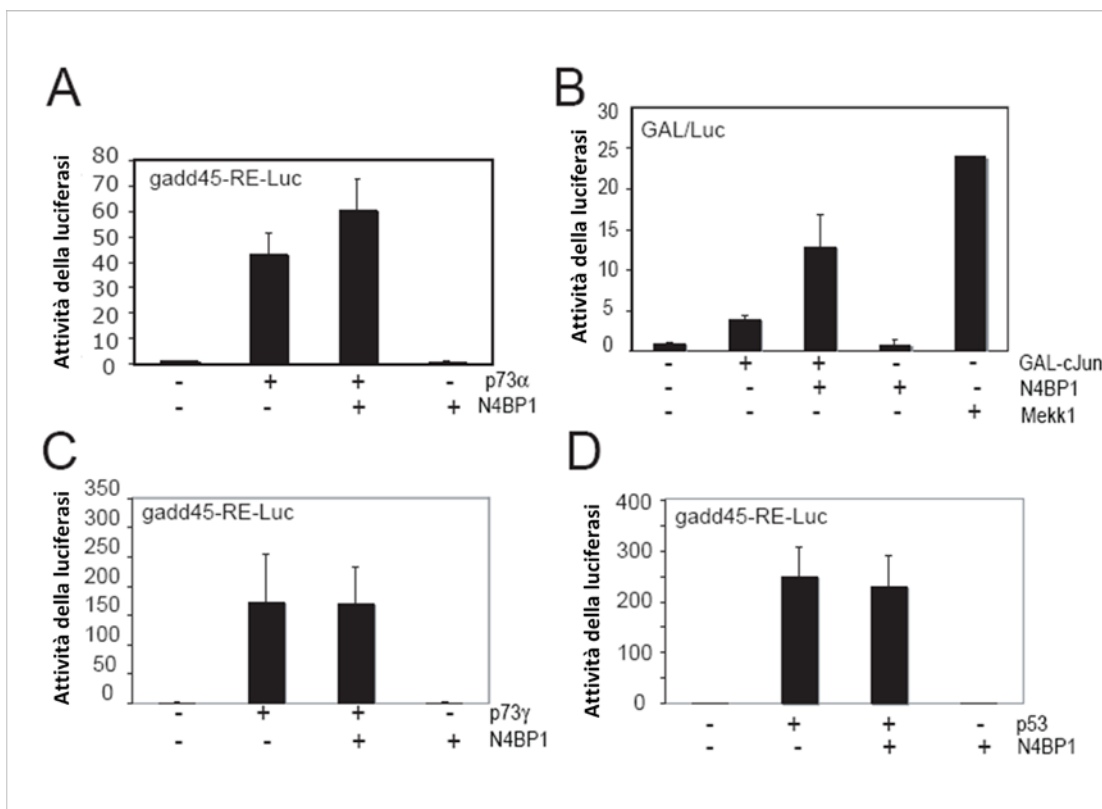


Figura 22: Effetto di N4BP1 sull'attività trascrizionale dei substrati di Itch. Le cellule H1299 sono state transientemente cotrasfettate con il plasmide reporter (Gadd45-RE-Luc) e con i vettori p73α (A), p73γ (C) e p53 (D), in presenza o in assenza di N4BP1. L'attività trascrizionale di c-Jun (B) è stata misurata cotrasfettando le cellule Hela con il vettore Gal4-c-Jun e con il reporter Gal-Luc in assenza o in presenza di N4BP1. Come controllo positivo è stato incluso Mekk1 in grado di attivare costitutivamente c-Jun. Dopo 24 ore dalla trasfezione, è stato condotto il saggio di luciferasi. Il vettore pRL-TK è stato incluso per normalizzare l'efficienza di trasfezione. L'attività basale della luciferasi è stata normalizzata con valore 1. I valori riportati nel grafico rappresentano la media +/- deviazione standard di tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato.

Per validare i risultati ottenuti dai saggi di luciferasi condotti su cellule umane, ci siamo proposti di esaminare l'attività trascrizionale di p73 nelle MEFs $N4BP1^{+/+}$ e $N4BP1^{-/-}$ cotrasfettate transientemente con un costrutto codificante la proteina TAp73α e con il plasmide reporter Gadd45-RE-Luc. Il grafico della figura 23A mostra come la transattivazione del promotore del gene *GADD45* dipendente dal fattore p73, sia notevolmente ridotta in cellule in cui N4BP1 è stato geneticamente deletato rispetto alle MEFs $N4BP1^{+/+}$.

Analoghi esperimenti sono stati condotti per monitorare l'attività trascrizionale di c-jun. Le MEFs $N4BP1^{+/+}$ e $N4BP1^{-/-}$ sono state co-trasfettate con i vettori esprimenti la galattosidasi-4 fusa al dominio di attivazione di c-Jun (GAL4-c-Jun) e il reporter GAL4-Luc come precedentemente descritto.

Utilizzando questo sistema sperimentale, abbiamo dimostrato che l'attività trascrizionale di c-jun è significativamente ridotta nelle cellule *N4BP1*^{-/-} paragonate alle cellule di controllo (figura 23B)

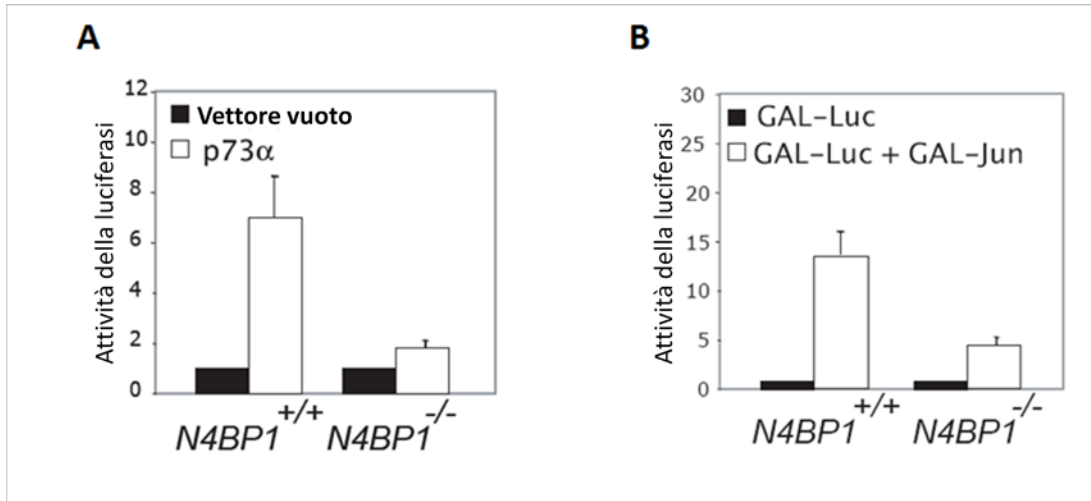


Figura 23: Il knockdown genetico di N4BP1 diminuisce l'attività trascrizionale di TAp73α e di c-Jun. Le MEF *N4BP1*^{+/+} e *N4BP1*^{-/-} sono state co-trasfettate con il plasmide reporter Gadd45-RE-Luc e con un vettore di espressione per TAp73α (pannello A). Per monitorare l'attività trascrizionale di c-Jun le MEF *N4BP1*^{+/+} e *N4BP1*^{-/-} sono state co-trasfettate con il vettore Gal4-C-Jun e con il reporter Gal-Luc (Pannello B). Dopo 24 ore dalla trasfezione, è stato condotto il saggio di luciferasi. Il vettore pRL-TK è stato incluso per normalizzare l'efficienza di trasfezione. L'attività basale della luciferasi è stata normalizzata con valore 1. I valori riportati nel grafico rappresentano la media $\pm$ deviazione standard di tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato.

4.2.4 N4BP1 compete con p73 per il legame con il dominio WW2 di Itch

Dopo aver identificato l'azione inibitoria di N4BP1 nei confronti di Itch, siamo andati ad indagare il meccanismo molecolare attraverso cui viene esercitata tale regolazione negativa. Come primo punto siamo andati a vedere la modalità di interazione tra N4BP1 e Itch, per poter identificare nel dettaglio la regione di legame. A questo scopo abbiamo condotto degli studi *in vitro* per mappare i siti di interazione tra N4BP1 e Itch. In particolare, abbiamo generato dei mutanti per delezione di Itch, costituiti dai singoli domini strutturali della proteina, fusi con il "tag" GST. Nel dettaglio sono stati clonati i seguenti frammenti: il GST-C2 costituito dalla porzione N-terminale, il GST-WW formato dalla regione centrale della proteina contenente i 4 domini WW, e il GST-HECT costituito dalla porzione carbossi-terminale dell'enzima. Per evitare problemi di solubilità legati alla presenza del dominio C2, la proteina di controllo, GST-

$\Delta C2$, è stata privata del dominio C2. I suddetti frammenti sono stati in seguito espressi in cellule batteriche e purificati mediante coniugazione alla resina glutatione-sefariosio, che lega selettivamente proteine che contengono il “tag” GST. Infine i frammenti purificati sono stati utilizzati per condurre un saggio di interazione *in vitro* con N4BP1, che è stato invece trascritto e tradotto *in vitro* utilizzando un sistema di estratti di reticolociti di coniglio. La figura 24A mostra che N4BP1 interagisce esclusivamente con la proteina di fusione GST-WW. Tale legame è inoltre paragonabile a quello che N4BP1 stabilisce con la proteina di controllo GST- $\Delta C2$. La specificità di legame è stata esaminata attraverso l’eventuale interazione di N4BP1 con la sola GST.

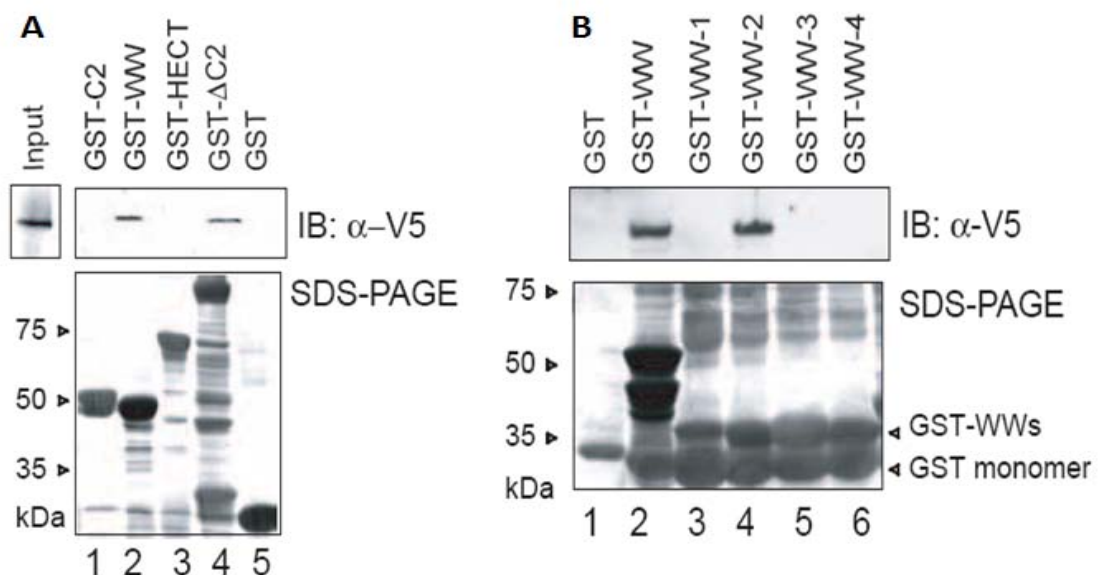


Figura 24: N4BP1 interagisce fisicamente con la regione centrale (WW) di Itch. A) La proteina GST utilizzata come controllo negativo o i singoli frammenti di Itch fusi con la GST sono stati coniugati alla resina glutatione-sefariosio. La resina successivamente è stata incubata con N4BP1-V5 tradotto *in vitro*. I complessi formati sono stati visualizzati attraverso IB utilizzando l’anticorpo anti-V5. La membrana è stata in seguito colorata con una soluzione di blue Coomassie (pannello in basso). B) La proteina GST o i singoli domini WW di Itch fusi con la GST sono stati coniugati alla resina glutatione-sefariosio. La resina successivamente è stata incubata con N4BP1-V5 tradotto *in vitro*. I complessi formati sono stati visualizzati attraverso un IB utilizzando l’anticorpo anti-V5. La membrana è stata in seguito colorata con una soluzione di blue Coomassie (pannello in basso).

Avendo identificato la porzione centrale di Itch come la regione responsabile dell'interazione con N4BP1, ci siamo preposti di indagare se e quale dei quattro domini WW sia direttamente responsabile del legame. A questo scopo abbiamo clonato, espresso in batteri e purificato, come descritto sopra, i singoli domini: WW1, WW2, WW3 e WW4 di Itch. Nuovamente abbiamo condotto un saggio di legame *in vitro* tra N4BP1, tradotto *in vitro* come precedentemente descritto, ed i singoli domini WW di Itch. La figura 24B mostra l'esistenza di una specificità di legame esclusivamente tra N4BP1 ed il secondo dominio WW (WW2) di Itch.

Dalla letteratura è noto che Itch interagisce con i suoi substrati attraverso uno dei suoi quattro domini WW. Il nostro gruppo ha precedentemente mappato l'interazione tra p73 e Itch identificando il legame tra la regione ricca in prolina (PY) posta all'estremità C-terminale di p73 e la regione centrale WW posizionata su Itch (Rossi et al., 2005). Avendo verificato che N4BP1, pur non essendo un substrato di Itch interagisce con la medesima regione centrale della ligasi, abbiamo ipotizzato che N4BP1 e p73, essendo in grado di legare la stessa regione su Itch, possano competere per lo stesso sito di legame. Per indagare questa ipotesi siamo andati per prima cosa a mappare l'esatta regione di interazione tra p73 e Itch. In particolare abbiamo determinato quale dei domini WW sia coinvolto nel legame con p73. A questo scopo abbiamo espresso TAp73 α come proteina di fusione con il "tag" istidina (His) nei batteri, ed in seguito l'abbiamo purificata utilizzando una resina ad ioni Nickel (Ni²⁺), che sfrutta l'alta affinità degli ioni di Ni²⁺ per l'His.

La proteina così prodotta è stata utilizzata in un saggio di legame *in vitro* in presenza della proteina di fusione GST-WW o dei singoli domini WW. I risultati ottenuti dimostrano che p73, analogamente a N4BP1, interagisce con il frammento contenente il dominio WW2 di Itch (Figura 24B).

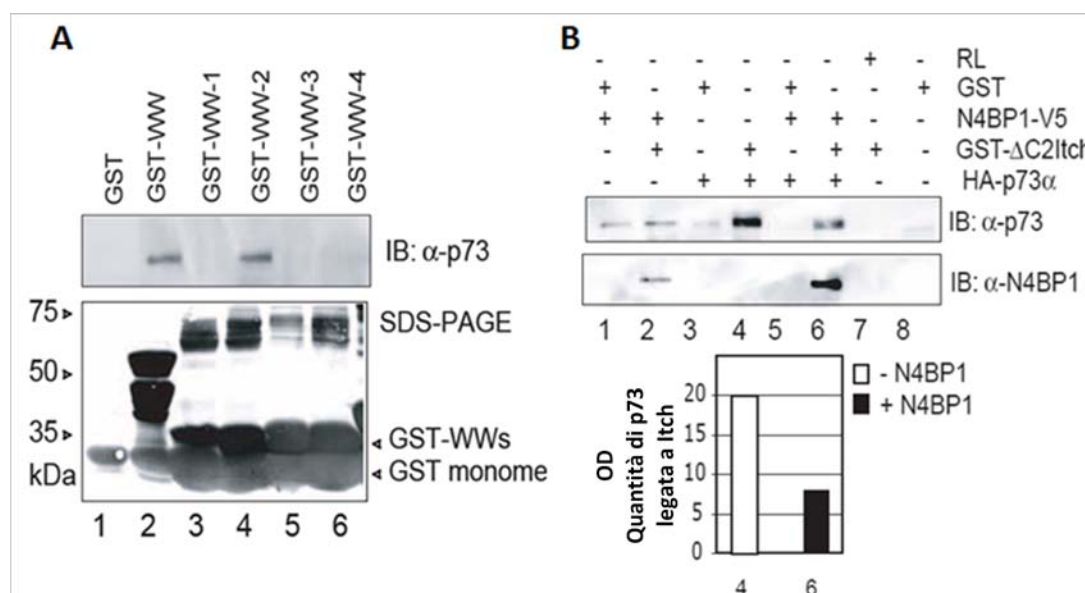


Figura 25: p73 e N4BP1 interagiscono con lo stesso sito di legame di Itch. A) La proteina GST ed i singoli domini WW di Itch fusi con la GST sono stati coniugati alla resina glutatione-sefariosio. La resina successivamente è stata incubata con p73-His purificata dai batteri. I complessi formati sono stati visualizzati attraverso un IB utilizzando l'anticorpo anti-p73. La membrana è stata in seguito colorata con una soluzione di blue Coomassie (Figura A pannello in basso). B) Gli esperimenti di competizione sono stati condotti utilizzando la proteina di fusione Δ C2Itch-GST legata alla resina di sefariosio-glutatione. Il complesso è stato poi incubato con p73-HA tradotto *in vitro*, in presenza di un eccesso pari a 6 volte di N4BP1-V5 anch'esso tradotto *in vitro*. I complessi sono stati evidenziati mediante IB con anti-p73 e con anti-N4BP1. Il legame tra p73 ed Itch è stato normalizzato attraverso l'IB anti-GST, ovvero attraverso la stima della quantità di Itch legata alla resina di sefariosio.

Questi esperimenti ci hanno indicato che p73 e N4BP1 interagiscono con il medesimo sito di legame presente nella molecola di Itch. Questa osservazione ha fornito un'ulteriore prova a favore dell'ipotesi di competizione tra N4BP1 e p73 per lo stesso sito di legame (WW2) posizionato su Itch, precedentemente illustrata. Al fine di verificare nel dettaglio questa ipotesi, abbiamo condotto un saggio di competizione *in vitro* utilizzando le proteine p73 e Itch, purificate dai batteri, e la proteina N4BP1 tradotta *in vitro* dal sistema dei reticolociti. I dati riportati in figura 25B mostrano che l'interazione tra p73 e Itch, monitorata attraverso un IB per rivelare p73, è drasticamente ridotta in presenza di N4BP1. Dai dati ottenuti e riportati in questa prima parte del lavoro di tesi di dottorato, si può concludere che abbiamo verificato il meccanismo d'azione attraverso il quale la neo-identificata proteina N4BP1 esercita la sua funzione inibitoria nei confronti di Itch. In particolare abbiamo verificato l'esistenza di un meccanismo di competizione tra il noto substrato di Itch, p73 e N4BP1. Le due proteine infatti legano lo stesso sito posizionato nella regione centrale (WW2) della ligasi (Figure 24B e 25A). Tramite questo meccanismo N4BP1 può interagire con Itch ed esercitare la

sua funzione inibitoria nei confronti della ligasi stessa. L'azione di N4BP1 si riflette con un aumento della stabilità e della funzionalità delle proteine bersaglio di Itch.

4.3 L'E3 ubiquitina ligasi CDL4a interagisce, multiubiquitina e controlla l'attività trascrizionale di p73

Parallelamente allo studio descritto in precedenza, la nostra attenzione è stata indirizzata anche verso la caratterizzazione di un altro meccanismo ubiquitina-dipendente di regolazione di p73. L'ipotesi di lavoro della seconda parte del mio progetto di ricerca si è basata sull'identificazione di un'interazione biochimica e funzionale tra p53 e la Cul4a (Nag et al., 2004). Dato l'elevato grado di identità di sequenza condiviso da p73 e p53, abbiamo ipotizzato l'esistenza di un'interazione tra p73 e la proteina Cul4a.

4.3.1 p73 interagisce con CDL4a tramite un legame diretto con DDB1

Abbiamo quindi condotto un saggio di immunoprecipitazione (IP) *in vivo*, utilizzando estratti proteici di cellule HEK293T precedentemente co-trasfettate con vettori di espressione per TAp73 α e la Cul4a. Nel primo esperimento abbiamo co-espresso p73 con l'epitopo HA, e la Cul4a con l'epitopo myc. Gli estratti cellulari sono stati lisati in condizioni non denaturanti, in modo da preservare l'eventuale interazione tra le due proteine. In seguito è stata condotta una IP per la Cul4a attraverso l'utilizzo della proteina G-sefariosio a cui era stato pre-adsorbito un anticorpo diretto contro l'epitopo Myc. La presenza di p73 nell'immunocomplesso contenente Cul4a è stata monitorata attraverso un IB diretto contro la proteina p73, utilizzando un anticorpo anti-HA. La figura 26A mostra l'esistenza di un legame tra p73 e Cul4a.

Ad ulteriore conferma di questo dato abbiamo condotto l'IP reciproca utilizzando lisati cellulari ottenuti da cellule trasfettate con il plasmide Myc-Cul4a in presenza di un vettore di espressione Flag-p73. In questo caso, gli estratti cellulari sono stati incubati con un anticorpo anti-flag e l'interazione tra le due proteine è stata verificata attraverso

un IB diretto contro l'epitopo myc. La figura 26B, evidenzia e conferma l'interazione tra p73 e Cul4a.

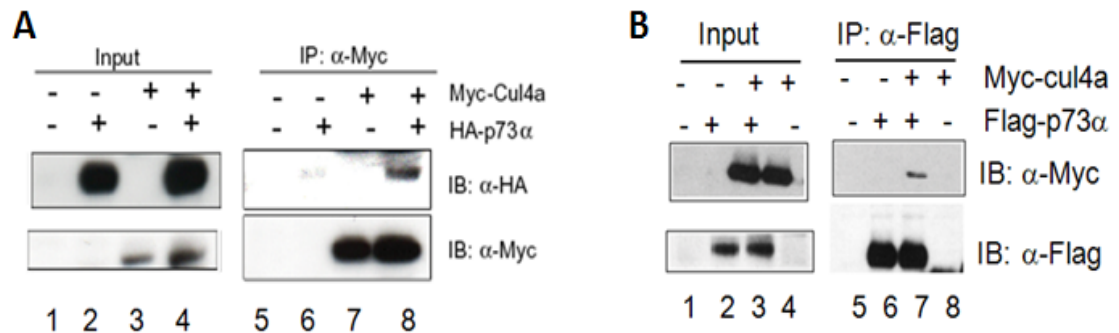


Figura 26: p73 interagisce con la cul4a. Le cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con i vettori esprimanti HA-p73 in presenza o in assenza di myc-Cul4a (A), oppure con flag-p73 in presenza o in assenza della myc-cul4a (B). Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate e la formazione degli immunocomplessi è stata monitorata attraverso una IP utilizzando anticorpi anti-myc (A), oppure anti-flag (B), seguita da un IB contro il “tag” HA (A) o contro il myc (B). Il controllo della IP è stato monitorato attraverso un IB anti-myc (A), oppure anti-flag (B). Mentre il controllo di trasfezione è visualizzato tramite l’analisi degli estratti cellulari (input) con IB anti-HA e anti-myc (A) oppure IB anti-myc e anti-flag (B).

Come descritto in precedenza (Hu et al., 2004; He et al., 2006; Higa et al., 2006) il complesso E3 CDL4a può utilizzare la proteina DDB1 sia come molecola adattatrice che come recettore per il reclutamento dei substrati. Poichè l’esistenza di un legame tra Cul4a e p73 suggerisce la possibilità che p73 rappresenti un substrato per questa E3, abbiamo voluto verificare se p73 possa interagire con il complesso multimerico indirettamente o direttamente attraverso la molecola DDB1. A questo scopo abbiamo condotto una IP *in vivo* in cellule umane HEK293T in cui sono stati overespressi entrambi i plasmidi di espressione HA-p73 e flag-DDB1. Gli estratti cellulari sono stati lisati e la proteina Flag-DDB1 è stata immunoprecipitata utilizzando un anticorpo anti-flag. Il legame tra p73 e DDB1 è stato evidenziato attraverso un IB per il tag di p73, HA (Figura 27A).

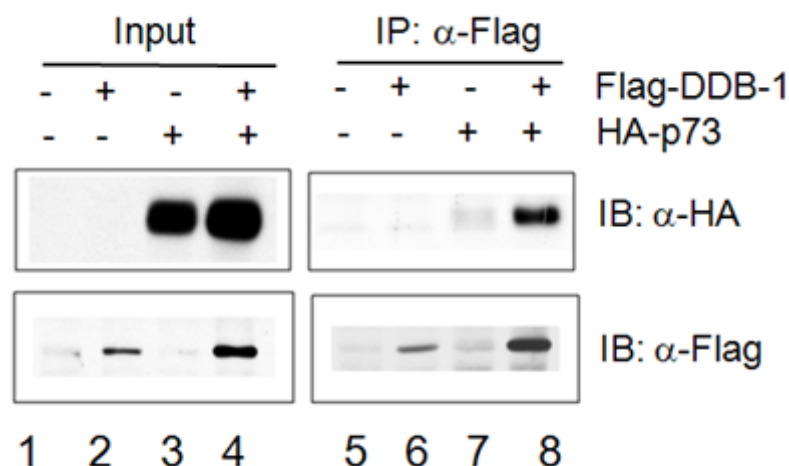


Figura 27A: p73 interagisce con DDB1. Le cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con un vettore esprimente HA-p73 in presenza o in assenza di flag-DDB1. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate, e gli estratti immunoprecipitati utilizzando un anticorpo anti-flag. La presenza di p73 negli immunocomplessi è stata rivelata mediante IB diretto contro il “tag”HA. Il controllo della IP è monitorato attraverso un IB anti-flag. Il controllo di trasfezione è visualizzato tramite l’analisi degli input con IB anti-HA e anti-flag.

Per confermare l’esistenza di un’interazione fisiologica tra p73 e DDB-1, abbiamo condotto un saggio di co-IP trasfettando unicamente Myc-TAp73, e rivelando la presenza di DDB1 endogeno negli immunocomplessi ottenuti immunoprecipitando myc-p73. La necessità di trasfettare p73 origina dai bassi livelli di espressione di p73, che rendono estremamente difficile immunoprecipitare la proteina p73 endogena. L’interazione tra le due proteine è stata messa in luce tramite IB utilizzando un anticorpo contro DDB1. La figura 27B mostra la presenza di un legame tra DDB1 endogeno e p73. Come controllo positivo abbiamo in parallelo immunoprecipitato gli estratti cellulari anche per la cul4a, noto interattore diretto di DDB1. Come atteso, la figura 27B mostra il legame tra DDB1 endogeno e la cul4a.

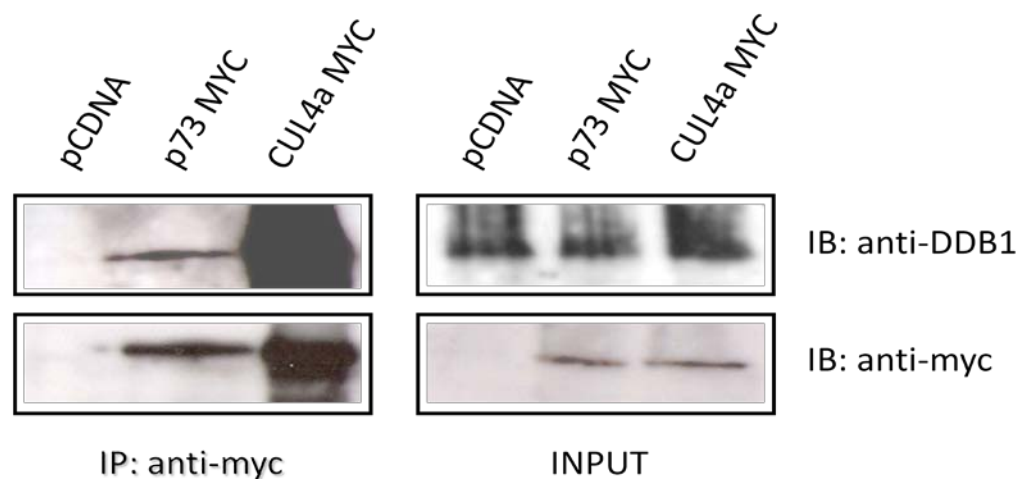


Figura 27B: p73 interagisce con DDB1 endogeno. Le cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con il vettore vuoto pCDNA, o con i vettori esprimenti p73-myc oppure cul4a-myc. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate e la formazione di un legame tra p73 e DDB1 è stato monitorato attraverso una IP utilizzando un anticorpo anti-myc, seguita da un IB contro anti-DDB1. Il controllo della IP è monitorato attraverso un IB anti-myc. Il controllo di trasfezione è visualizzato tramite l'analisi degli input con IB anti-DDB1 e anti-myc.

Dopo aver stabilito l'esistenza a livello endogeno di un'interazione tra p73 e DDB1, abbiamo iniziato a mappare la regione di p73 responsabile del suddetto legame. A questo scopo abbiamo generato due mutanti di delezione di p73: il primo definito p73-DBD è costituito dalla porzione N-terminale della proteina e comprende il TAD e il DBD (aminoacidi 1-319), mentre il secondo chiamato p73-CT, è costituito dalla regione carbossi-terminale, in cui sono presenti l'OD e il dominio SAM (aminoacidi 318-627). Entrambi i mutanti prodotti sono stati marcati con il l'epitopo HA, e sono stati utilizzati per il saggio di IP *in vivo*, descritto in Figura 27C. Le cellule HEK293T, sono state trasfettate con i due mutanti HA-DBD e HA-CT e come controllo con il vettore esprimente la forma intera di p73 (HAp73FL). Gli estratti cellulari sono stati immunoprecipitati con un anticorpo diretto contro l'epitopo HA, ed attraverso un IB contro DDB1 abbiamo identificato p73-DBD come la regione di p73 che interagisce con DDB1 (figura 27C). Stiamo attualmente producendo ulteriori mutanti per delezione di p73 allo scopo di identificare la regione minima di legame a DDB1.

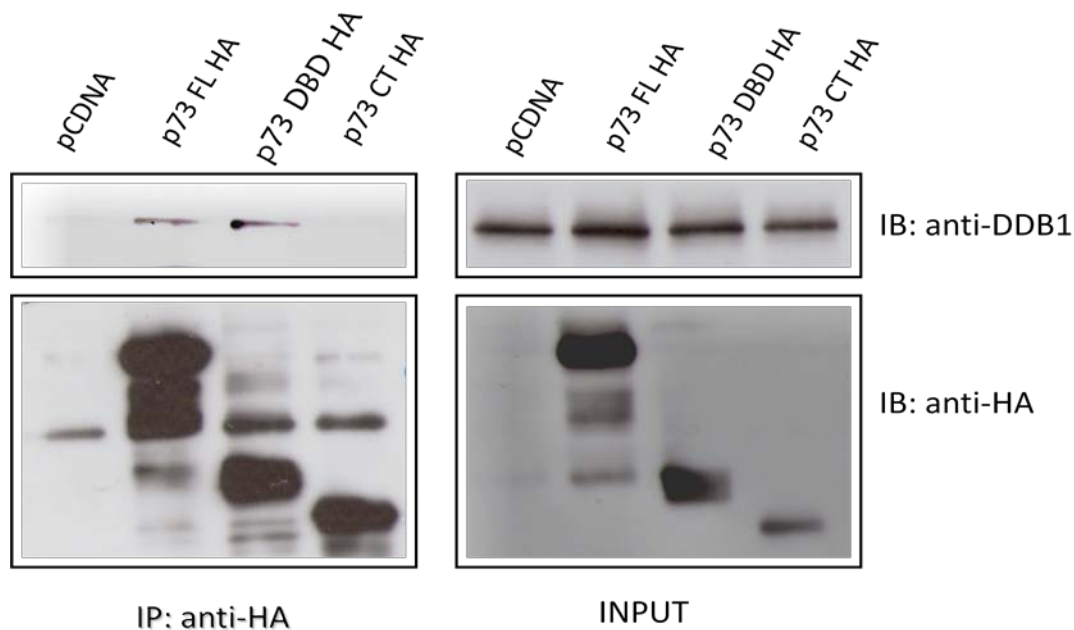


Figura 27C: La regione N-terminale di p73 interagisce con DDB1 endogeno. Le cellule HEK293T sono state trasfettate transientemente con il vettore vuoto pCDNA, o con i vettori esprimanti p73FL-HA oppure p73DBD-HA o ancora p73CT-HA. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate e la formazione di un legame tra p73 e DDB1 è stata verificata attraverso una IP utilizzando un anticorpo anti-HA, seguita da un IB contro anti-DDB1. Il controllo della IP è stato monitorato attraverso un IB anti-HA. Il controllo della trasfezione è visualizzato tramite l'analisi degli input con IB anti-DDB1 e anti-HA.

I substrati di CDL4a possono interagire con la ligasi o tramite un legame diretto con DDB1 o per mezzo di una proteina accessoria.

Per verificare se il legame tra DDB1 e p73 sia diretto abbiamo condotto dei saggi di legame *in vitro* utilizzando proteine purificate. A questo scopo abbiamo purificato un complesso (Cul4a:DDB1:ROC1) CDL4a, composto dalla cul4a, da ROC1 e da DDB1, da cellule precedentemente infettate con il baculovirus esprimente il complesso sopraindicato. Questo approccio permette di purificare un complesso E3 che conserva la sua attività enzimatica, e che pertanto si rivela molto utile ai fini dei saggi funzionali descritti di seguito. Parallelamente abbiamo purificato la proteina His-TAp73 α , come descritto precedentemente. In seguito abbiamo eseguito un saggio di legame *in vitro*, in cui His-TAp73 α viene pre-adsorbita ad una resina ad ioni Ni²⁺, la quale viene successivamente incubata con il complesso Cul4a:DDB1:ROC1. Il legame di p73 al complesso CDL4a è stato rivelato mediante IB, utilizzando un anticorpo anti-DDB1 (figura 28A). L'esistenza di un'interazione diretta tra p73 e DDB1 è stata quindi confermata attraverso un ulteriore saggio di legame *in vitro*, in cui abbiamo valutato la capacità di Cul4a trascritta e tradotta *in vitro* di interagire con His-TAp73 α . Come atteso

dalla natura di “scaffold” molecolare delle subunità di cullina nei complessi CDL, la Cul4a purificata non è in grado reclutare direttamente p73 (figura 28B). Prendendo in esame entrambi i saggi condotti *in vitro*, si può concludere che p73 venga reclutato al complesso CDL4a attraverso il suo legame diretto con il recettore DDB1.

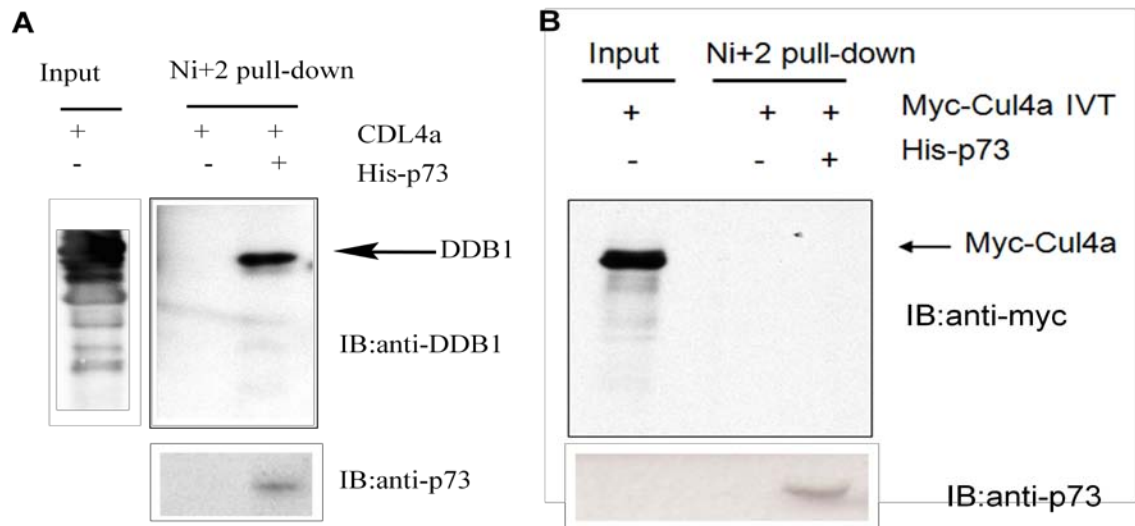


Figura 28: p73 interagisce fisicamente con il complesso CDL4a. La proteina His-TAp73 α viene pre-incubata con una resina ad ioni Ni²⁺, per 30 min. La resina viene quindi incubata con il complesso ricombinante CDL4a (Cul4a:DDB:ROC1) purificato (A) oppure con Myc-Cul4a trascritta e tradotta *in vitro* (B), per 1 ora. Dopo aver lavato la resina, His-TAp73 α viene eluita utilizzando elevate concentrazioni di imidazolo (250 mM). La formazione del legame di p73 al complesso CDL4a e a Cul4a è stata evidenziata attraverso un IB anti DDB1 (A) e anti Cul4a (B) rispettivamente.

4.3.2 CDL4a multi-ubiquitina p73

Alla luce di questo risultato, abbiamo ipotizzato che p73 possa essere un substrato per la reazione catalizzata dal complesso CDL4a.

Per esaminare la capacità del complesso CDL4a di catalizzare la reazione di ubiquitinazione di p73, abbiamo condotto un saggio di ubiquitinazione *in vitro* utilizzando il complesso CDL4a purificato da cellule eucariotiche mediante la tecnica dell'IP. In particolare, abbiamo overespresso Myc-Cul4a nelle cellule HEK293T, e utilizzato un anticorpo anti-Myc per isolare la E3 CDL4a in condizioni non denaturanti, che preservano l'attività enzimatica del complesso. HA-TAp73 α è stato invece sintetizzato mediante il sistema del lisato dei reticolociti. Le proteine purificate sono state utilizzate per eseguire un saggio di ubiquitinazione *in vitro*, in cui il substrato

viene incubato in presenza degli enzimi E1, E2 ed E3 (CDL4a) e di un eccesso di ubiquitina. La presenza di specie ubiquitinate di p73 è stata rivelata mediante IB utilizzando un anticorpo anti-HA. La figura 29 mostra che, in presenza del complesso CDL4a, p73 viene modificato mediante coniugazione, di molecole di ubiquitina. La presenza di forme ubiquitinate di p73 può essere visualizzata con la comparsa di bande discrete di ubiquitinazione (figura 29).

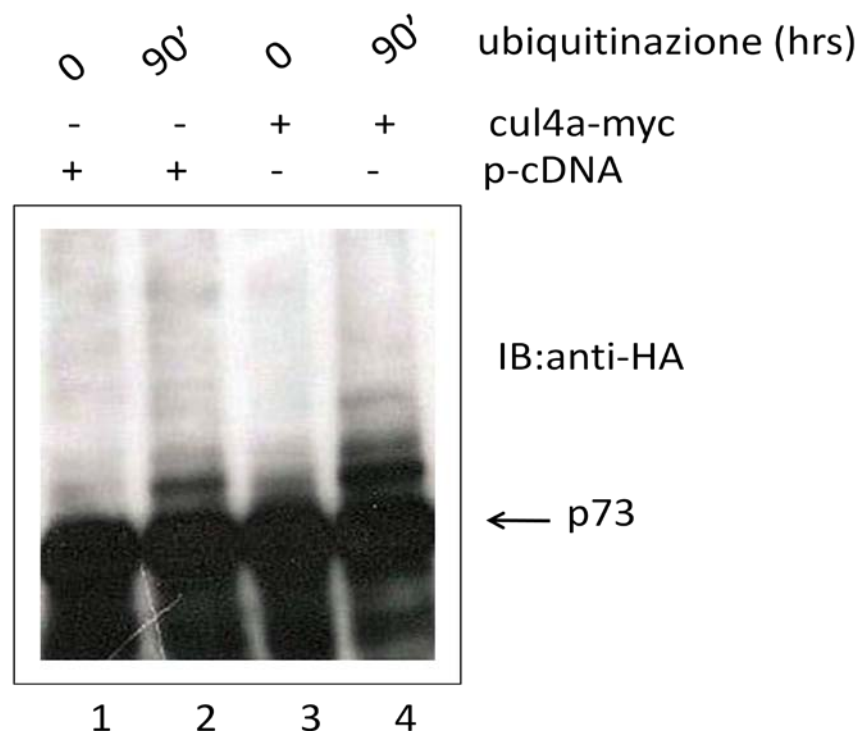
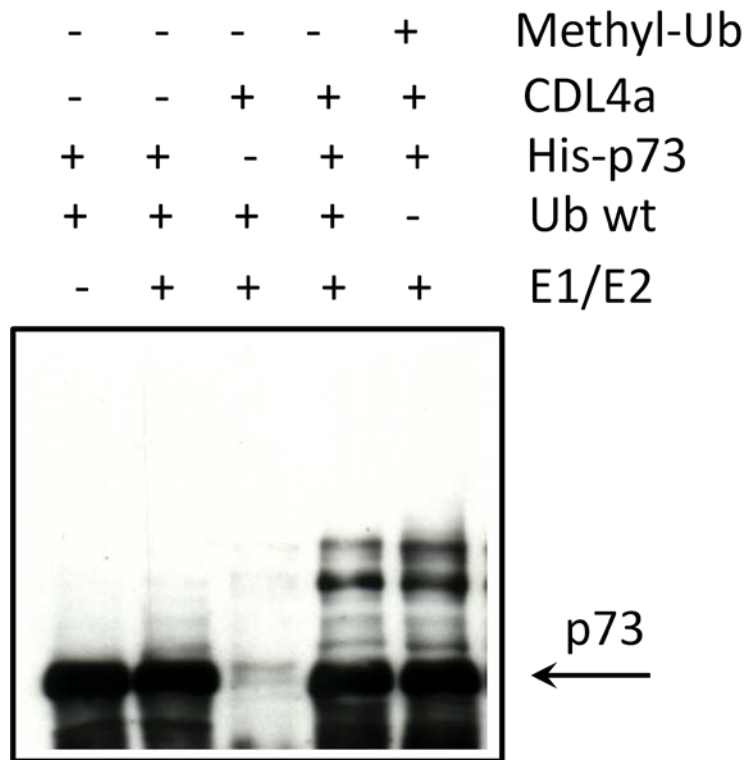


Figura 29: Ubiquitinazione di p73 CDL4a-dipendente. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti il vettore vuoto (linee 1 e 2) o la cul4a (linee 3 e 4). Le cellule sono state lisate e la cul4a è stata immunoprecipitata con l'anticorpo anti-myc. In seguito è stato condotto il saggio di ubiquitinazione in presenza di E1, E2, p73-HA tradotto con il sistema dei reticolociti, e un eccesso di ub wt. Dopo 90min di reazione sono state visualizzate le forme ubiquitinate di p73 mediante un IB anti-HA.

I risultati mostrati nella figura 11 ci hanno suggerito che p73 non sia substrato per un evento di poliubiquitinazione ma che venga piuttosto modificato mediante multi-ubiquitinazione dal complesso CDL4a. La presenza di bande discrete di ubiquitinazione è infatti indicativa della coniugazione delle molecole di ubiquitina a singoli residui di

lisina nella proteina substrato. Al contrario, la formazione di catene poliubiquitina determina la comparsa di specie ubiquitinate ad elevato peso molecolare (Thrower et al., 2000). Al fine di confermare la natura della reazione di ubiquitinazione catalizzata dalla CDL4a nel modificare p73, abbiamo condotto un ulteriore saggio di ubiquitinazione *in vitro*, in cui in parallelo all'ubiquitina wild-type viene utilizzata l'ubiquitina metilata. In questa forma modificata di ubiquitina la presenza del gruppo metilico impedisce l'estensione delle catene di poliubiquitina (Hicke, 2001); la metil-ubiquitina (Met-Ub) può quindi catalizzare solamente reazioni di multi-ubiquitinazione. L'esperimento mostrato nella figura 30, è stato eseguito utilizzando esclusivamente molecole ricombinanti purificate. In questo modo, possiamo escludere la possibilità che p73 venga modificato in vivo da enzimi E3 che co-immunoprecipitano con Cul4a, o che l'ubiquitina sia stata coniugata ad una proteina che è associata a p73. Come fonte di E3, abbiamo utilizzato il complesso nativo Cul4a:DDB1:ROC1 purificato da baculovirus e descritto precedentemente. E' importante sottolineare che la capacità del complesso purificato Cul4a:DDB1:ROC1 di catalizzare la formazione di specie ubiquitinate di p73 convalida ulteriormente l'azione diretta del complesso nell'ubiquitinazione di p73 (Figura 30). Come mostrato dalla figura 30 l'utilizzo della Met-Ub nella reazione *in vitro* non è in grado di alterare il profilo di ubiquitinazione di p73 catalizzato dal complesso CDL4a in presenza di ubiquitina wild-type. In particolare si identificano delle bande discrete di ubiquitinazione, che indicano che p73 viene covalentemente modificato dal complesso CDL4a su residui distinti di lisina.



IB: anti-p73

Figura 30: Il complesso CDL4a multi-ubiquitina p73. Il complesso nativo Cul4a:DDB1:ROC1 purificato da baculovirus e la proteina p73-His purificata dai batteri sono stati utilizzati nel saggio di ubiquitinazione *in vitro*. La reazione è stata condotta in presenza degli enzimi E1, E2 e in eccesso di Ub wt o di Ub met. Le bande di ubiquitinazione di p73 sono state visualizzate mediante un IB anti-p73.

4.3.3 CDL4A non influenza la stabilità di p73

Avendo dimostrato che p73 non viene poliubiquitinato dal complesso CDL4a, ed essendo la poliubiquitinazione generalmente responsabile della regolazione della degradazione proteosoma-dipendente delle proteine, abbiamo ipotizzato che la modificazione catalizzata dalla CDL4a non determini alcuna variazione della stabilità di p73. Per poter verificare questa ipotesi, sono stati condotti i seguenti studi.

In primo luogo abbiamo condotto esperimenti in cellule HEK293T in cui sono stati coespressi i vettori di espressione HA-TAp73 α e Myc-Cul4a o Flag-DDB1. Per verificare un'eventuale modulazione dei livelli proteici di p73, abbiamo trasfettato il cDNA che codifica per Cul4a o per DDB1 in dosi crescenti, mentre i livelli di HA-TAp73 α sono stati mantenuti costanti. Le cellule sono stati lisate ed in seguito sono stati

monitorati i livelli di espressione proteica di p73 attraverso un IB diretto contro l'epitopo HA. La figura 31 mostra che i livelli del fattore p73 non diminuiscono in seguito all'overespressione di Cul4a (pannello A) o di DDB1 (pannello B), ma bensì aumentano. Tale effetto potrebbe essere provocato da un'interferenza con la degradazione proteosoma dipendente di p73, attraverso la competizione con un'altra E3 ligasi, per i medesimi residui di lisina.

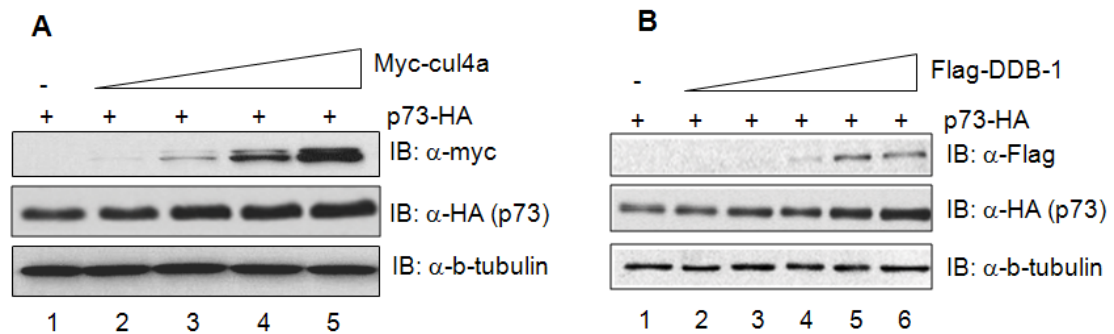


Figura 31: La cul4a e DDB1 non alterano la stabilità di p73. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con il vettore esprimente HA-p73 in presenza di dosi crescenti di myc-cul4a (A) o di flag-DDB1 (B). Le cellule sono state raccolte dopo 24h dalla trasfezione, lisate ed esaminate attraverso un IB anti HA (p73). Gli IB anti-tubulina sono stati utilizzati come controllo del caricamento. Gli IB anti-myc (A) e anti-flag (B) sono stati usati per visualizzare l'efficienza di trasfezione

Per avere un'ulteriore conferma che la stabilità di p73 non sia influenzata dall'attività di E3 della CDL4a, abbiamo eseguito esperimenti mirati ad esaminare gli effetti di Cul4a e DDB1 sull'emivita di p73. Le cellule HEK293T sono state cotrasfettate con i plasmidi esprimenti HA-p73, myc-cul4a e flag-DDB1 ed in seguito sono state trattate con la CHX, un inibitore della sintesi proteica.

Gli estratti cellulari sono stati esaminati per IB utilizzando un anticorpo anti-HA per monitorare i livelli di p73 in seguito a trattamento con CHX. I dati riportati in figura 32, dimostrano che l'overespressione della Cul4a (pannello B) o di DDB1 (pannello C) non sono in grado di influenzare significativamente l'emivita di p73, rispetto alle cellule di controllo (A). Come controllo positivo dell'esperimento, abbiamo cotrasfettato HA-p73 con myc-Itch. Come mostrato nella figura 32D, Itch riduce notevolmente l'emivita di p73.

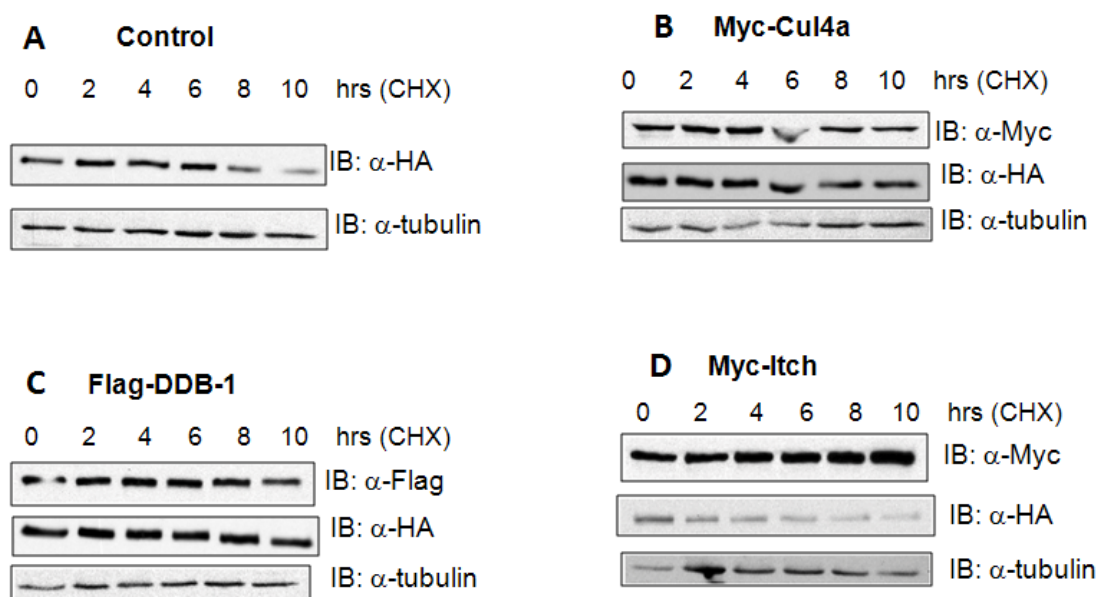


Figura 32: L'emivita di p73 non è influenzata dai componenti del complesso CDL4a. Le cellule HEK 293T sono state trasfettate con il vettore di espressione per HA-TAp73 da solo (A) o in cotrasfezione con i vettori Myc-cul4a (B), oppure Flag-DDB1 (C) o infine Myc-Itch, come controllo positivo (D). Ventiquattro ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate con la CHX (80 µg/ml) e sono state raccolte ai diversi tempi di trattamento (0, 2, 4, 6, 8 e 10 ore). Gli estratti cellulari sono stati esaminati tramite IB utilizzando un anticorpo anti-HA. Le membrane sono state incubate anche con gli anticorpi anti-myc e anti-flag per controllare l'efficienza di trasfezione e con l'anticorpo anti-tubulina per controllare il caricamento.

Ad ulteriore conferma dei risultati ottenuti fin'ora, abbiamo testato l'effetto dell'ablazione di DDB1 sui livelli proteici di p73 conducendo esperimenti di silenziamento transiente in cellule HCT-116, mediante la tecnica dell'RNAi.

La significativa riduzione dei livelli di DDB1 mostrata nel pannello superiore della figura 33A, non determina alcuna variazione dei livelli proteici di p73 (Figura 33A).

Parallelamente abbiamo effettuato esperimenti simili in una linea cellulare umana di carcinoma della mammella (BT-20), in cui p53 è mutato. L'assenza di p53 rende queste cellule un ottimo modello sperimentale per verificare la specificità di azione del complesso CDL4a nei confronti di p73.

In queste cellule, DDB1 è stato silenziato in maniera stabile mediante trasduzione lentivirale. In seguito ad infezione lentivirale, l'oligo shRNA specifico per DDB1 viene introdotto ed integrato nella cellula, dando origine al corrispondente siRNA. Quest'ultimo a sua volta, è in grado di appaiarsi con il messaggero di DDB1 e mediarne la degradazione. Il lentivirus utilizzato oltre a codificare per un mRNA

specifico per DDB1, codifica anche per l'antibiotico puromicina, consentendo la selezione delle cellule infettate. Le cellule dopo essere state raccolte, sono state lisate ed in seguito sono stati monitorati i livelli di espressione proteica di p73. L'IB mostrato in figura 33B evidenzia come i livelli endogeni di p73 non vengano modificati in seguito a delezione di DDB1, a differenza dei livelli proteici di p27, noto substrato di DDB1. L'efficienza dell'infezione e del silenziamento è stata misurata mediante IB diretto contro DDB1.

Per validare i risultati ottenuti nelle cellule umane mediante RNAi, abbiamo esaminato i livelli proteici di p73 in MEFs wild-type (*Cul4a*^{+/+}) ed in cellule knock out per Cul4a (*Cul4a*^{-/-}). Gli estratti cellulari sono stati sottoposti ad IB per monitorare i livelli di p73 e di alcuni dei substrati canonici del complesso CDL4a. Utilizzando anche questo sistema sperimentale, non si denotano variazioni nell'espressione proteica di p73 nelle cellule *Cul4a*^{-/-} paragonate con le MEFs di controllo (Figura 33C). Come controlli positivi, sono stati condotti degli IB utilizzando anticorpi diretti contro le proteine p27 e c-jun. Entrambe le proteine si accumulano in assenza di Cul4a, come è stato precedentemente dimostrato.

Esperimenti simili sono stati eseguiti in MEFs modificate geneticamente attraverso la tecnologia della ricombinazione sito specifica Cre/lox. In seguito ad infezione adenovirale di queste cellule si ottiene il silenziamento transiente della proteina DDB1 (Cang et al., 2006). Cellule infettate con Ad-Cre per 3 giorni non mostrano differenze nei livelli proteici di p73 se paragonate con il virus di controllo (figura 33D). Al contrario, p27 e c-jun, usati come controlli positivi, si accumulano in seguito alla deplezione di DDB1, come precedentemente dimostrato.

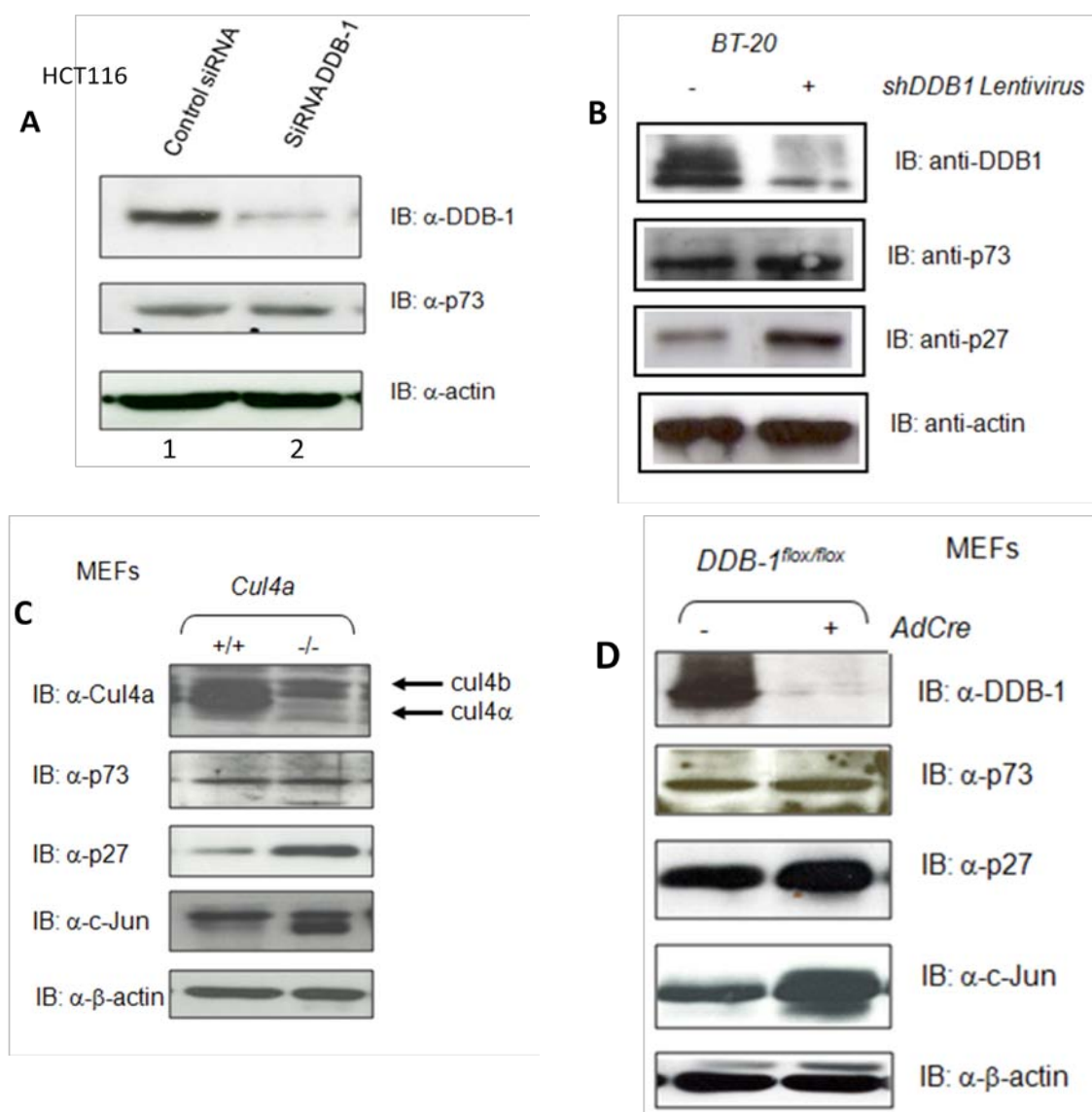


Figura 33: Il silenziamento dei componenti del complesso CDL4a non determina variazioni nei livelli proteici di p73. A) Le cellule HCT116 sono state trasfettate con l'oligo di controllo (corsia 1) o con l'oligo per il silenziamento di DDB1 (corsia 2). Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte, lisate e analizzate tramite IB usando un anticorpo anti-p73. Gli IB anti-DDB1 e anti-actina sono stati utilizzati rispettivamente come controlli di trasfezione e di caricamento. B) Le cellule BT-20 sono state infettate con il vettore lentivirale contenente un oligonucleotide complementare alla sequenza dell'mRNA di DDB1. I cloni che esprimevano ridotti livelli di DDB1 sono stati selezionati in mezzo di coltura contenente puomicina ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Gli estratti cellulari sono stati esaminati mediante IB contro p73. La funzionalità del sistema utilizzato è stata monitorata attraverso un IB anti-p27. Il silenziamento lentivirale è stato verificato misurando i livelli di DDB1. Il controllo di caricamento è stato visualizzato attraverso un IB anti-actina. C) Gli estratti cellulari ottenuti da MEF *Cul4a* $^{+/+}$ e *Cul4a* $^{-/-}$ sono stati esaminati attraverso IB utilizzando un anticorpo anti-p73. La funzionalità del sistema utilizzato è stata monitorata attraverso IB anti-p27 e anti-c-Jun. Il sistema knock out è stato controllato misurando i livelli di Cul4a: l'anticorpo utilizzato non discrimina tra le due diverse proteine cul4a e cul4b, ma mostra chiaramente un'assenza di espressione della forma cul4a.

Il controllo di caricamento è stato visualizzato attraverso un IB anti-actina. D) MEF *DDB1* $^{flox/flox}$ sono state infettate con un costrutto adenovirale contenente la ricombinasi Cre (Ad-Cre). Tre giorni dopo l'infezione, le cellule sono state raccolte e lisate. Gli estratti cellulari sono stati esaminati mediante IB utilizzando un anticorpo anti-p73. La funzionalità del sistema utilizzato è stata monitorata attraverso IB anti-p27 e anti-c-Jun. Il sistema knock out è stato controllato misurando i livelli di DDB1. Il controllo di caricamento è stato visualizzato attraverso un IB anti-actina.

4.3.4 CDL4A regola l'attività trascrizionale di p73

Poiché CDL4a non regola la stabilità di p73, ci siamo preposti di indagare se la sua attività trascrizionale possa essere modulata in seguito alla multiubiquitinazione catalizzata dal complesso. A questo scopo, abbiamo condotto dei saggi di luciferasi utilizzando promotori di geni bersaglio di p73. In maniera simile a quanto descritto precedentemente le cellule H1299 sono state co-trasfettate con un costrutto codificante la proteina TAp73 α e con il plasmide reporter Gadd45-RE-Luc, in assenza od in presenza di Cul4a o di DDB1. L'overespressione di entrambi i componenti del complesso CDL4a è responsabile di un effetto inibitorio nei confronti dell'attivazione p73-dipendente del promotore del gene GADD45 (figura 34A e B). La repressione trascrizionale è del 30% e del 58% per Cul4a (figura 34A) e DDB1 (figura 34B), rispettivamente.

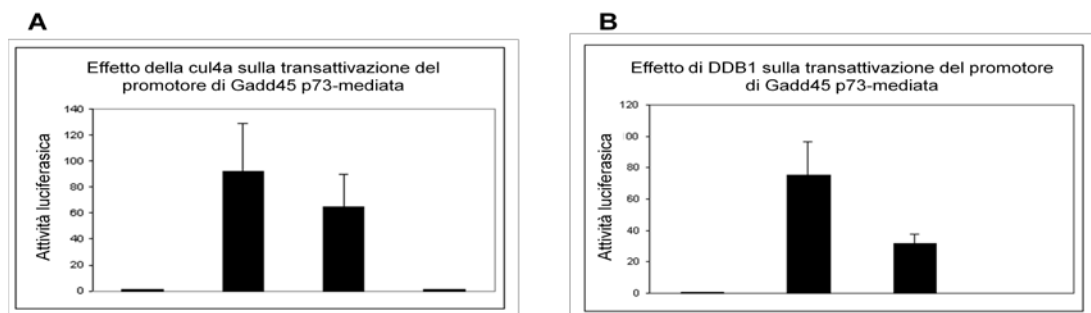


Figura 34: Effetto dell'ubiquitinazione catalizzata dal complesso CDL4a sulla transattivazione p73-dipendente del promotore di Gadd45. Le cellule H1299 sono state transientemente cotrasfettate con il plasmide reporter Gadd45-RE-Luc e con un vettore che codifica per p73 α , in assenza o in presenza della cul4a (A), DDB1 (B) o entrambe le subunità del complesso (C). Dopo 24 ore dalla trasfezione, è stato condotto il saggio di luciferasi. Il vettore pRL-TK è stato incluso per normalizzare l'efficienza di trasfezione. L'attività basale della luciferasi è stata normalizzata con valore 1. I valori riportati nel grafico rappresentano dalla media $\pm$ la deviazione standard di tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato.

Risultati simili sono stati ottenuti monitorando l'effetto di Cul4a sulla transattivazione del promotore di p21 (dati non mostrati), mettendo così in luce un effetto inibitorio generalizzato sui diversi geni bersaglio di p73.

I dati ottenuti fin'ora hanno permesso di individuare una funzione inibitoria da parte del complesso CDL4a nei confronti dell'attività trascrizionale di p73. Per confermare la funzione inibitoria della E3 ed esplorarne le conseguenze fisiologiche, abbiamo esaminato l'effetto dell'ablazione di DDB1 sui livelli di alcuni geni bersaglio di p73. A questo scopo, abbiamo utilizzato il modello cellulare delle BT-20, in cui DDB1 viene silenziato in maniera stabile mediante infezione lentivirale, come descritto in precedenza. In questo sistema cellulare abbiamo misurato i livelli di espressione di alcuni geni bersaglio di p73 attraverso studi di PCR semiquantitativa. In particolare abbiamo osservato che l'espressione di Puma e di p21 aumenta in seguito alla delezione di DDB1 relativamente alle cellule silenziate con l'oligo di controllo (figura 35A).

Il risultato ottenuto a livello dell'mRNA è stato confermato a livello proteico utilizzando il medesimo sistema sperimentale. Le cellule BT-20 sono state lisate e gli estratti cellulari sottoposti ad IB per le proteine codificate dai diversi geni bersaglio di p73. La figura 35B mostra che sia i livelli proteici di puma che quelli di p21 aumentano in assenza di DDB1, mentre p73, come atteso, non subisce alcuna variazione. Come controllo della funzionalità del sistema studiato, si può notare che i livelli proteici di p27 sono aumentati nelle cellule knock out per DDB1, rispetto alle cellule di controllo (figura 35B).

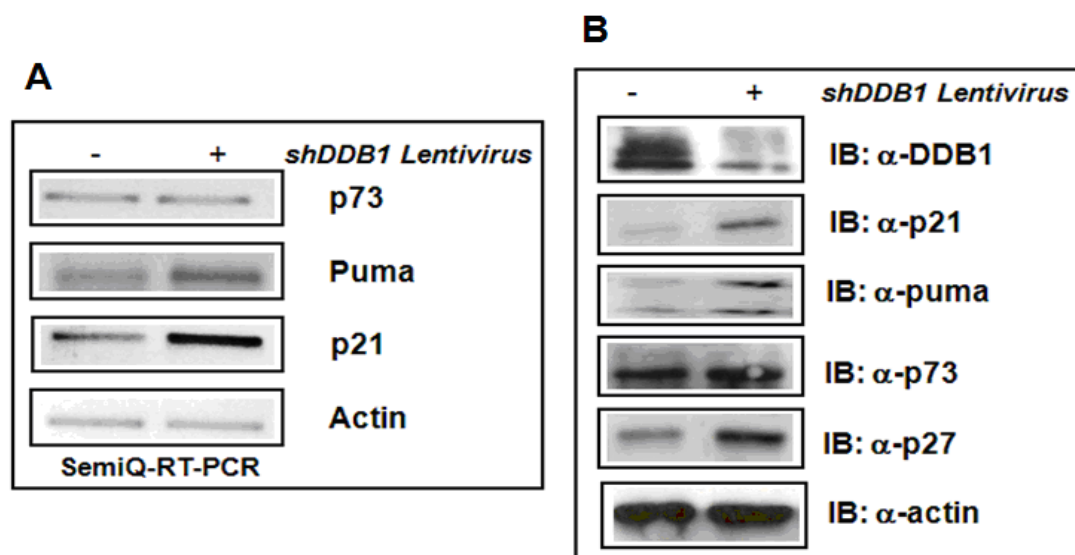


Figura 35: Il silenziamento di DDB1 induce i geni bersaglio di p73. Le cellule BT-20 sono state infettate con il vettore lentivirale contenente un oligonucleotide complementare alla sequenza dell'mRNA di DDB1. Come controllo negativo sono state utilizzate cellule BT-20 infettate con un vettore lentivirale contenente un oligonucleotide scramble. Dopo la selezione in puromicina (2 μ g/ μ l) dei cloni knock out per DDB1, l'RNA è stato estratto, retrotrascritto ed analizzato attraverso PCR semiquantitativa per l'espressione di p21, Puma, e p73 (A). La PCR semiquantitativa è stata condotta come controllo anche sull'actina. (B) Parallelamente, le cellule sono state lisate ed esaminate attraverso un IB tramite l'uso degli anticorpi anti-p21, anti-puma, ed anti-p73. Il silenziamento lentivirale è stato verificato misurando i livelli proteici di DDB1. La funzionalità del sistema è stata testata con un IB anti-p27 ed il caricamento è stato normalizzato con un IB anti-actina.

Studi analoghi sono stati eseguiti utilizzando anche le cellule knock out per la Cul4a e DDB1 descritte precedentemente. Studi di PCR semiquantitativa hanno rivelato che alcuni geni bersaglio di p73 vengono regolati positivamente in assenza della Cul4a. In particolare, abbiamo osservato un'induzione dell'mRNA di Noxa e di Puma, mentre i livelli di p21 e di Bax rimangono sostanzialmente invariati (Figura 36). L'analisi dell'espressione di c-jun è stata invece presa in esame come controllo negativo del sistema sperimentale utilizzato, in quanto, a differenza dei suoi livelli proteici, l'mRNA non subisce alcuna variazione in assenza della Cul4a (Figura 36).

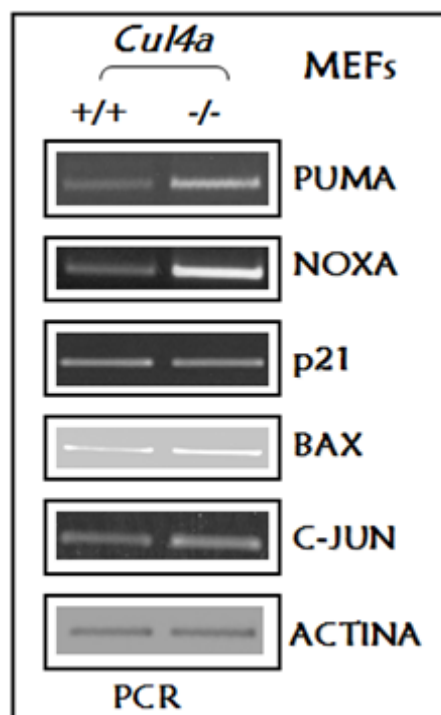


Figura 36: Il knockdown genetico della Cul4a induce l'espressione dell'mRNA dei geni bersaglio di p73. Gli RNA estratti da MEF *Cul4a*^{+/+} e *Cul4a*^{-/-} sono stati retrotrascritti e successivamente esaminati attraverso PCR semiquantitativa per l'espressione di Puma, Noxa, p21, e Bax. I livelli di espressione degli mRNA di c-Jun e dell'actina sono stati utilizzati come controllo del sistema utilizzato e come controllo di normalizzazione, rispettivamente.

Infine abbiamo analizzato i livelli dei geni bersaglio di p73 anche in MEFs DDB1 Flox/Flox. In maniera simile a quanto osservato per le MEFs knock out per la *cul4a*, l'assenza di DDB1 influenza la capacità di p73 di indurre i suoi geni bersaglio. In particolare i trascritti dei geni che codificano per Noxa, Bax, Gadd45 e Puma aumentano in assenza di DDB1, rispetto alle cellule infettate con il virus di controllo (figura 37A). Come controllo del sistema utilizzato abbiamo monitorato l'espressione di c-jun, che risulta invariata nelle cellule knock out per DDB1 relativamente alle cellule di controllo.

Abbiamo inoltre condotto nello stesso sistema cellulare degli studi di PCR real-time, per analizzare in maniera quantitativa i livelli di espressione genica di p21 in seguito alla delezione di DDB1 (dati non mostrati). I livelli di p21 risultano aumentati di 6.5 volte relativamente alle cellule di controllo.

Infine, abbiamo confermato il dato ottenuto per l'espressione di p21 nelle cellule infettate con Ad-Cre, anche a livello proteico. Come evidenziato dalla figura 37B, i livelli proteici di p21 subiscono un incremento in seguito alla delezione genica di DDB1.

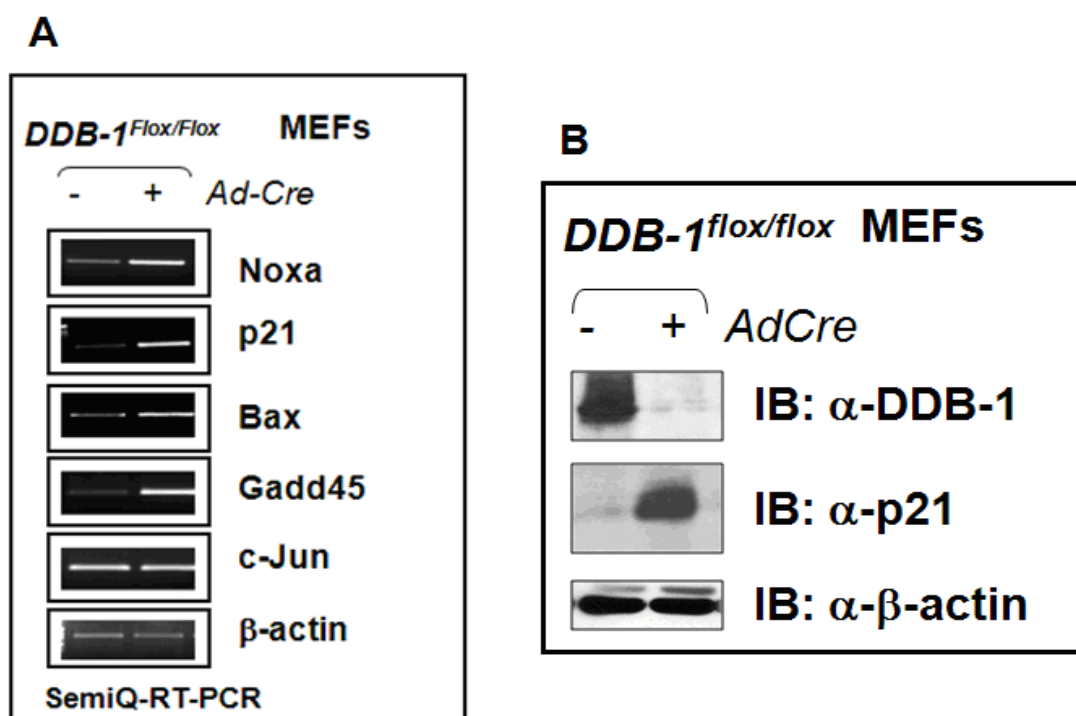


Figura 37: La delezione di DDB1 determina un'induzione dell'espressione dei geni bersaglio di p73. I MEF DDB1 Flox/Flox sono stati infettati con Ad-Cres per 3 giorni. (A) L'mRNA è stato estratto e retrotrascritto e attraverso PCR semiquantitativa, sono stati esaminati gli mRNA dei geni codificanti per Noxa, p21, Bax, e Gadd45. I livelli di espressione degli mRNA di c-Jun e dell'actina sono stati utilizzati come controllo del sistema utilizzato e come controllo di normalizzazione, rispettivamente. (B) gli estratti cellulari sono stati esaminati attraverso IB utilizzando un anticorpo anti-p21. L'IB contro DDB1 è stato usato come controllo dell'infezione, mentre l'IB anti-actina è stato utilizzato come controllo di caricamento.

I risultati mostrati in questa seconda parte del lavoro, mostrano l'identificazione di una nuova E3 ligasi: CDL4a in grado di multiubiquitinare p73.

In particolare è stata identificata la prima ligasi in grado di esercitare un controllo sulla funzionalità di p73. Le ligasi di p73 identificate fin'ora agiscono infatti esclusivamente sulla stabilità di p73 stesso. L'azione svolta dal complesso CDL4a, si riflette in una inibizione dell'attività trascrizionale di p73, che a sua volta influenza l'espressione genica dei diversi geni bersaglio di p73.

5. DISCUSSIONE

Il fattore trascrizionale p73, analogamente agli altri membri della famiglia p53, è costituito da un dominio di transattivazione (TA), un dominio di legame al DNA (DBD) ed un dominio di oligodimerizzazione (OD). La regione che mostra il più alto grado di omologia tra p73 e p53 è la regione di legame al DNA (DBD), per questa caratteristica p73 è in grado di interagire con le stesse regioni responsive poste nei promotori di vari geni controllati da p53.

Il fattore trascrizionale p73 esiste in due isoforme principali: la forma TA e la forma ΔN . All'isoforma trascrizionalmente attiva TAp73 è attribuito un ruolo pro-apoptotico in quanto è capace di mediare la morte cellulare indotta da stress genotossici modulando la trascrizione dei geni coinvolti nella risposta apoptotica.

L'isoforma $\Delta Np73$, mancando del dominio TA, non è in grado di svolgere attività trascrizionale, ed agisce come dominante negativo nei confronti dell'attività di TAp73 e di p53 (Ishimoto et al., 2002; Grob et al., 2001). All'isoforma $\Delta Np73$ viene quindi attribuita una funzione anti-apoptotica.

Benchè mutazioni a carico del gene p73 sono rare nei tumori, diverse osservazioni hanno però suggerito un ruolo chiave di p73 durante la cancerogenesi. Le varie isoforme di $\Delta Np73$ sono debolmente espresse o addirittura assenti in tessuti normali ma risultano overespresse in alcuni tumori come negli epatocarcinomi, nei tumori ovarici e in alcune linee di melanomi (Fauridoni-Laurens et al., 2008; Fillippovich et al., 2001; Ikawa et al., 1999; Ng et al., 2000; O'Nions et al., 2001; Douc-Rasy et al., 2002). Inoltre $\Delta Np73$ è in grado di indurre immortalizzazione di cellule primarie e coopera con l'oncogene RAS nella formazione di tumori *in vivo* (Petrenko et al., 2003).

Viceversa le isoforme TAp73 risultano debolmente espresse in tessuti cancerogeni (Oswald and Stiewe, 2008). Inoltre l'espressione ectopica di TAp73 induce arresto del ciclo cellulare, apoptosi o senescenza in dipendenza dal contesto cellulare (Holcakova et al., 2008).

Recentemente studi condotti su topi deleti selettivamente per la sola isoforma TAp73 hanno evidenziato che l'assenza di questa isoforma determina un'aumento dell'instabilità genomica, una maggiore predisposizione per la formazione di tumori

spontanei ed una più elevata sensibilità a composti chimici carcinogeni in paragone con topi WT esprimenti entrambe le isoforme di p73 (Tomasini et al., 2008).

I dati presentati portano ad attribuire all'isoforma TAp73 un ruolo di soppressore tumorale, mentre all'isoforma Δ Np73 viene conferito un ruolo di oncogene (Ikawa et al., 1999; Yang et al., 2000).

I dati sopra descritti suggeriscono che la diversa proporzione delle varianti TA e Δ N, piuttosto che le loro diverse mutazioni, sono importanti nella patogenesi tumorale.

E' necessario pertanto chiarire i meccanismi molecolari che regolano l'espressione di p73 per comprendere meglio il loro coinvolgimento nello sviluppo tumorale.

Nel mio progetto di dottorato, mi sono concentrata sullo studio della regolazione ubiquitina-dipendente dell'isoforma TAp73. In cellule di mammifero i livelli proteici di TAp73 sono regolati principalmente da Itch, una E3 ubiquitina ligasi contenente il dominio catalitico HECT. In condizione normali Itch lega, ubiquitina e induce la degradazione proteosoma-dipendente di p73.

In questa tesi abbiamo caratterizzato la proteina N4BP1 come un regolatore negativo di Itch. Inoltre, abbiamo identificato il complesso CDL4 come una E3 ligasi capace di regolare l'attività trascrizionale di p73. Di seguito verranno discussi in maniera separata i risultati conseguiti.

5.1 Ruolo di N4BP1 nella regolazione di Itch e dei suoi substrati .

La HECT ligasi Itch è stata oggetto di studio del nostro laboratorio in quanto responsabile dell'ubiquitinazione e della successiva degradazione proteosoma-dipendente di p73. I miei studi sono stati indirizzati verso l'analisi della modalità d'azione della proteina N4BP1, interattore di Itch, e delle conseguenze funzionali prodotte sui substrati della ligasi.

Numerosi meccanismi di regolazione dell'attività di Itch sono stati ampiamente caratterizzati e comprendono sia modificazioni post-traduzionali che interazioni con differenti proteine regolatrici. Brevemente, l'attivazione catalitica di Itch risulta essere dipendente dall'azione della chinasi1 Jun N-terminale (JNK). JNK è infatti responsabile della fosforilazione di Itch nei residui Ser/Thr. In seguito alla fosforilazione la ligasi subisce un cambiamento conformazionale tale da permettere un'apertura della struttura

ed una conseguente interazione con i suoi substrati (Gao et al., 2004; Gallagher et al., 2006). Un'altra chinasi coinvolta nella regolazione dell'attività di Itch è Src Fyn. Fyn fosforilando Itch nel residuo Tyr373 impedisce l'interazione tra la ligasi e i suoi substrati regolando negativamente l'attività catalitica di Itch (Yang et al., 2006).

Recentemente sono stati identificati degli interattori di Itch: Ndfip1 e Numb. Ndfip1 interagisce con Itch in seguito a stimolazione delle cellule T e potenzia l'attività catalitica di Itch (Hettema et al., 2004; Oliver et al., 2006). Analogamente, Numb è responsabile di una regolazione positiva nei confronti dell'attività di ubiquitinazione di Itch, determinando un incremento della degradazione proteasoma-dipendente di Notch (McGill et al., 2003).

Ad oggi non era però stata identificata alcuna proteina interattore di Itch con funzione inibitoria. Nel nostro laboratorio è stata dimostrata l'interazione tra la proteina a funzione ignota N4BP1 (interattore della ligasi Nedd4) ed Itch.

Lo studio del ruolo di N4BP1 nella regolazione di Itch e la caratterizzazione del meccanismo molecolare che ne è alla base, costituiscono l'argomento della prima parte del mio lavoro di dottorato.

Attraverso differenti approcci biologici quali il silenziamento in cellule umane o l'utilizzo di knock down genetico in modelli murini, abbiamo osservato che l'assenza di N4BP1 induce una riduzione dei livelli proteici dei vari substrati di Itch, quali p73, c-Jun e JunB dovuta ad una loro maggiore degradazione proteosoma-dipendente.

In particolare la stabilità di c-Jun è stata monitorata in cellule MEF N4BP1 WT vs KO. L'induzione del substrato di Itch, in seguito a trattamento con radiazioni ultraviolette è notevolmente ridotta in cellule MEF N4BP1 KO rispetto alle cellule N4BP1 WT. Parallelamente ad una riduzione dei livelli proteici di c-jun e di p73 abbiamo osservato che in cellule MEF N4BP1 KO l'attività trascrizionale di entrambi i fattori risulta notevolmente ridotta se paragonata all'attività in cellule N4BP1 WT. Abbiamo inoltre dimostrato che l'overespressione di N4BP1, in maniera reciproca alla sua delezione, induce un aumento sia dell'emivita che dell'attività trascrizionale di entrambi c-Jun e p73. Presi tutti insieme, questi dati dimostrano che N4BP1 svolge un'attività inibitoria nei confronti di Itch modulando l'ubiquitinazione e la degradazione proteosoma-dipendente dei suoi diversi substrati.

Abbiamo poi indagato nel dettaglio il meccanismo attraverso il quale N4BP1 esercita la sua azione nei confronti di Itch.

Tramite saggi di legami *in vitro*, abbiamo dimostrato che N4BP1 e p73 legano lo stesso dominio WW2 di Itch suggerendo quindi un meccanismo di competizione tra le due proteine per il legame alla ligasi. In particolare tramite un saggio di competizione *in vitro*, abbiamo dimostrato che N4BP1 compete con p73 per il legame ad Itch.

È noto dalla letteratura che i livelli di Itch diminuiscono in seguito a danno genotossico, condizione in cui p73 si accumula e viene indotto trascrizionalmente per svolgere le sue funzioni pro-apoptotiche (Rossi et al., 2005). Parallelamente alla diminuzione dei livelli di Itch, l'attivazione di N4BP1 potrebbe costituire un ulteriore meccanismo “di difesa” esercitato dalle cellule in risposta al danno al DNA. Al fine di comprendere più dettagliatamente la funzione svolta da N4BP1 sarà interessante studiare se questa proteina possa essere modulata in condizioni di stress cellulare o di danno al DNA, ovvero in tutti quei processi biologici in cui p73 risulta essere più attivo. Per esempio, meccanismi di inibizione dell'attività di ubiquitinazione di Itch su p73 potrebbero determinare un rapido aumento dei livelli proteici di p73. Nel contesto descritto potrebbe essere plausibile l'ipotesi di un aumento dei livelli proteici di N4BP1 in seguito a danno o a stress cellulare in maniera da inibire la funzionalità della ligasi Itch e conseguentemente permettere un aumento della stabilità dei suoi vari substrati tra cui p73. p73 potrebbe in queste condizioni esercitare la sua funzione trascrizionale e transattivare i diversi geni bersaglio coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione apoptotica.

Lo studio presentato in questa prima parte della tesi, identifica in N4BP1 un nuovo regolatore dell'attività catalitica di Itch. Inoltre tale studio suggerisce un nuovo meccanismo che potrebbe regolare la stabilità di p73 in seguito a danno al DNA e conseguentemente modulare la risposta apoptotica dopo trattamento chemioterapico (Figura 38).

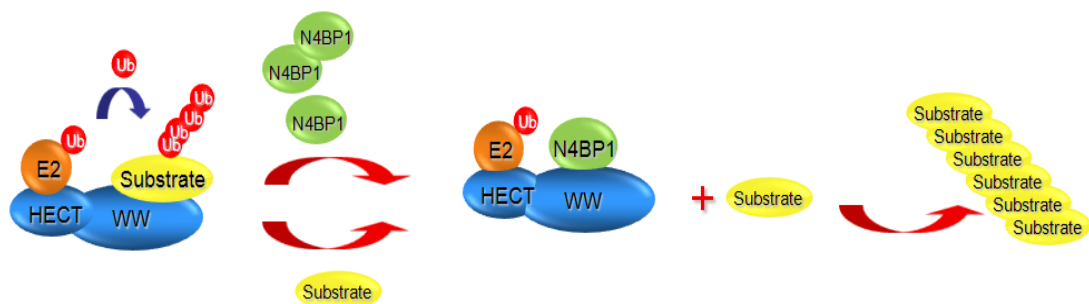


Figura 38: Modello del meccanismo d'azione di N4BP1. N4BP1 compete con i substrati di Itch per lo stesso sito di legame (dominio WW2) posto sulla ligasi. L'interazione tra N4BP1 e la ligasi determina un accumulo dei substrati con conseguente aumento della loro attività trascrizionale.

Nel loro complesso, i risultati mostrati portano alla conclusione che N4BP1 eserciti una funzione di controllo secondario ed indiretto sui diversi substrati di Itch. Questa evidenza risulta molto interessante nell'ottica di un ipotetico impiego di molecole analoghe a N4BP1 come agenti in grado di contrastare l'attività catalitica di Itch con successivo aumento della stabilità dei suoi substrati.

5.2 Ruolo di CDL4a nella regolazione dell'attività trascrizionale di p73.

L'E3 ligasi multimerica CDL4a è responsabile dell'ubiquitinazione e conseguente regolazione di numerosi substrati coinvolti sia nei processi di risposta al danno al DNA, quali DDB2 e XPC (Sugasawa et al., 2005), sia nella progressione del ciclo cellulare, quali p21, p27 e la ciclina E. (Cang et al., 2006; Takata et al., 2004; Abbas et al., 2008).

L'ubiquitinazione dei substrati di CDL4a può prevedere la formazione di catene di poliubiquitina sulle proteine substrato, con conseguente degradazione ad opera del proteosoma (Higa et al., 2003; Nishitani et al., 2006), oppure può mediare il legame di singole molecole di ubiquitina su singoli residui di lisina dei substrati, regolando in questo modo diverse funzioni biologiche (Higa et al., 2006; Osley et al., 2006). L'ubiquitinazione degli istoni H3/H4 ad opera del complesso CDL4a è un chiaro esempio di ubiquitinazione regolativa. In seguito al danno al DNA causato da radiazioni UV, il complesso CDL4a è in grado di ubiquitinare gli istoni, e di reclutare e ubiquitinare, attraverso la proteina DDB2, il complesso preposto al riparo del DNA contenente XPC per renderlo più affine al legame al DNA danneggiato (Wang et al., 2006).

In questa seconda parte della tesi mi sono occupata di studiare l'eventuale ruolo di CDL4a nella regolazione di p73. Tale ipotesi di lavoro è scaturita dall'osservazione che Cul4a, una subunità del complesso CDL4a, interagisce con p53 e ne favorisce l'ubiquitinazione mediata da MDM2 (Nag et al., 2004). Vista l'alta omologia tra p53 e p73, abbiamo quindi ipotizzato che CDL4a potesse interagire con p73. Abbiamo inizialmente dimostrato che CDL4a lega p73 tramite un legame diretto con la subunità recettoriale DDB1. L'interazione tra i suddetti fattori coinvolge la porzione N-terminale di p73, in cui è presente il dominio DBD. Il dato ottenuto risulta interessante per una

migliore interpretazione dell'effetto inibitorio esercitato dal complesso CDL4a nei confronti dell'attività trascrizionale di p73 (vedi di seguito). Abbiamo inoltre verificato se CDL4a potesse ubiquitinare p73. Tramite saggi di ubiquitinazione *in vitro* abbiamo dimostrato che CDL4a non è in grado di poliubiquitinare p73 ma bensì è capace di catalizzare la formazione di discrete bande di ubiquitinazione. Tale profilo di ubiquitinazione non viene alterato dall'uso della metil ubiquitina indicando che si tratta di bande di mono-multiubiquitinazione.

Poiché la poliubiquitinazione media generalmente la degradazione proteosoma-dipendente delle proteine bersaglio, i risultati ottenuti *in vitro* suggeriscono che CDL4a non controlla la degradazione proteolitica di p73 *in vivo*. A conferma di ciò abbiamo dimostrato che l'overespressione dei componenti cul4a o DDB1, non influenza l'emivita di p73. Inoltre, cellule KO per Cul4a o DDB1 non mostrano nessuna variazione dei livelli proteici di p73, rafforzando quindi l'ipotesi di un ruolo non degradativo dell'ubiquitinazione di p73 mediata da CDL4.

Di conseguenza, abbiamo ipotizzato una funzione regolativa di CDL4 sull'attività trascrizionale di p73. Mediante saggi di luciferasi utilizzando promotori di geni bersaglio di p73, abbiamo osservato che in seguito all'overespressione di cul4a o DDB1 la capacità trascrizionale di p73 viene inibita. Reciprocamente, l'assenza dei fattori cul4a o DDB1 sia in cellule umane che murine ha messo in luce un incremento dell'espressione dei messaggeri di diversi target di p73 visualizzati tramite PCR semiquantitativa e real time PCR.

In conclusione, in questa seconda parte del mio lavoro di tesi abbiamo dimostrato che CDL4a è in grado di legare e di multiubiquitinare p73, inibendo la sua attività trascrizionale.

CDL4a risulta quindi la prima E3 ligasi identificata ad essere in grado di agire esclusivamente sulla funzionalità di p73 e non sulla sua stabilità.

L'interazione identificata tra p73 e CDL4a avviene attraverso il dominio di legame al DNA e risulta possibile che la conseguente reazione di multiubiquitinazione possa coinvolgere residui di lisina che sono posti in esso. In questo dominio sono anche presenti i residui di lisina che vengono acetilati dall'enzima p300/CBP, acetilazione che è responsabile di una conseguente induzione dell'attività trascrizionale di p73. Dai risultati ottenuti è plausibile ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di competizione tra la reazione di acetilazione p300/CBP-dipendente e la reazione di multiubiquitinazione CDL4a-dipendente. Studi futuri possono essere indirizzati proprio nell'identificare i

residui di lisina coinvolti nell'ubiquitinazione e nel comprendere quando i due meccanismi possano avere luogo nella cellula, eventualmente competendo.

La cul4a è amplificata nel 16% dei tumori primari umani alla mammella e nel 47% di questi risulta essere espressa in maniera aberrante (Abba et al., 2007; Gupta et al., 2002; Chen et al., 1998). Inoltre la cul4a risulta essere amplificata geneticamente anche in carcinomi esofagei ed epatocellulari (Yasui et al., 2002).

Alla luce dei risultati ottenuti, è plausibile ipotizzare che l'amplificazione della cul4a riscontrata potrebbe causare alterazione del ciclo cellulare e della risposta chemioterapica e aumento della progressione tumorale in maniera direttamente dipendente dalla sua azione sulla funzione di p73. In cellule in cui l'espressione di Cul4 è amplificata, p73 potrebbe infatti essere sottoposta ad una incrementata multiubiquitinazione da parte del complesso CDL4a, e di conseguenza la sua attività trascrizionale potrebbe essere notevolmente inibita favorendo la progressione tumorale. In quest'ottica studi futuri potrebbero essere mirati all'identificazione di inibitori del complesso CDL4a da impiegare per lo sviluppo di strategie e tecniche antitumorali.

ELENCO ABBREVIAZIONI

Ad-Cre	costrutto adenovirale contenente la ricombinasi Cre
AKT/PI3K	fosfatidilinositolo 3-chinasi
APC	cellule presentanti l'antigene
APC/C	subunità del complesso promuovente l'anafase/ciclosoma
AS	splicing alternativo
BIR	elemento di riconoscimento del substrato
CDKI	inibitore della chinasi ciclina-dipendente
CDL	E3 ligasi cullina-dipendenti
CDL4a	complesso multi-proteico Cul4a-dipendente
ChIP	immunoprecipitazione della cromatina
CHX	cicloesimide
CSA	proteina A della sindrome di Cocayne
DBD	dominio di legame al DNA
DDB1	proteina legante il DNA danneggiato
E1	enzima di attivazione dell'ubiquitina
E2	enzima di coniugazione dell'ubiquitina
E3	enzima ubiquitina ligasi
E6-AP	proteina associata all'E6
EGFR	recettori dei fattori di crescita
EnaC	canali epiteliali del sodio
HECT	omologo dell'estremità C-term della proteina associata all'E6
IAP _s	proteine inibitori dell'apoptosi
IB	immunoblotting
Il-4	interleuchina 4
IP	immunoprecipitazione
JNK1	chinasi Jun N-terminale1
Mdm2	mouse double minute2
MEFs	fibroblasti murini embrionali
Met-Ub	metil-ubiquitina

N4BP1	proteina interattore di Nedd4
Ndfip1	proteina interattore della famiglia Nedd4-1
Nedd4	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4
NER	risposta all'escissione nucleotidica
NGF	fattore di crescita nervoso
NQO1	NADH chinone riduttasi
NS	splicing canonico
OD	dominio di oligodimerizzazione
p300/CBP	cAMP-responsive element binding protein
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PKC-θ	proteina chinasi θ
PLC-γ1	fosfolipasi C-γ1
PR	dominio ricco in proline
REp53	regioni responsive a p53
RNAi	RNA interference
RTK	recettori delle tirosin chinasi
SAM	motivo alpha sterile
TA	isoforma attiva trascrizionalmente
TAD	dominio di transattivazione
XPC	proteina xeroderma pigmentosum del gruppo C
ΔN	isoforma priva del dominio di trans attivazione

BIBLIOGRAFIA

Abba MC, Fabris VT, Hu Y, Kittrell FS, Cai WW, Donehower LA, Sahin A, Medina D, Aldaz CM.2007 Identification of novel amplification gene targets in mouse and human breast cancer at a syntenic cluster mapping to mouse ch8A1 and human ch13q34. Cancer Res. 2007 May 1;67(9):4104-12.

Abbas T, Sivaprasad U, Terai K, Amador V, Pagano M, Dutta A.2008 PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. Genes Dev. 2008 Sep 15;22(18):2496-506.

Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M.2005 The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. Cell. 2005 Nov 4;123(3):409-21.

Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y.1999 Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. Nature. 1999 Jun 24;399(6738):809-13.

Al-Hakim AK, Zagorska A, Chapman L, Deak M, Pegg M, Alessi DR.2008 Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. Biochem J. 2008 Apr 15;411(2):249-60.

Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, Zheng N.2006 Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. Nature. 2006 Oct 5;443(7111):590-3.

Arias EE, Walter JC.2006 PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. Nat Cell Biol. 2006 Jan;8(1):84-90. Epub 2005 Dec 18.

Arnason T, Ellison MJ.1994 Stress resistance in Saccharomyces cerevisiae is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. Mol Cell Biol. 1994 Dec;14(12):7876-83.

Arrowsmith CH. 1999 Structure and function in the p53 family. Cell Death Differ. 1999 Dec;6(12):1169-73. Review.

Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y.2001 Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 30;98(3):1188-93. Epub 2001 Jan 23.

Asher G, Shaul Y.2005 p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story. Cell Cycle. 2005 Aug;4(8):1015-8. Epub 2005 Aug 7. Review.

Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, Shaul Y.2005 A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. Genes Dev. 2005 Feb 1;19(3):316-21.

Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ.1996 SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. Cell. 1996 Jul 26;86(2):263-74.

Bálint E, Bates S, Vousden KH.1999 Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. Oncogene. 1999 Jul 8;18(27):3923-9.

Banks D, Wu M, Higa LA, Gavrilova N, Quan J, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H.2006 L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. Cell Cycle. 2006 Aug;5(15):1719-29. Epub 2006 Aug 1.

Barrera FN, Poveda JA, González-Ros JM, Neira JL.2003 Binding of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes. J Biol Chem. 2003 Nov 21;278(47):46878-85. Epub 2003 Sep 3.

Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigianti G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T.2003 p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. Cancer Cell. 2003 Apr;3(4):387-402.

Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X.2004 ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. Mol Cell Biol. 2004 Feb;24(3):1341-50.

Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, Melino G, Pandolfi PP.2004 Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. J Exp Med. 2004 Jun 7;199(11):1545-57.

Bienko M, Green CM, Crosetto N, Rudolf F, Zapart G, Coull B, Kannouche P, Wider G, Peter M, Lehmann AR, Hofmann K, Dikic I.2005 Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. Science. 2005 Dec 16;310(5755):1821-4.

Blandino G, Levine AJ, Oren M.1999 Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene*. 1999 Jan 14;18(2):477-85.

Blint E, Phillips AC, Kozlov S, Stewart CL, Vousden KH.2002 Induction of p57(KIP2) expression by p73beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3529-34. Epub 2002 Mar 12.

Borden KL, Freemont PS.1996 The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol*. 1996 Jun;6(3):395-401. Review.

Böttger A, Böttger V, Garcia-Echeverria C, Chène P, Hochkeppel HK, Sampson W, Ang K, Howard SF, Picksley SM, Lane DP.1997 Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J Mol Biol*. 1997 Jun 27;269(5):744-56.

Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, Abrams JM.2000 Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*. 2000 Mar 31;101(1):103-13.

Cam H, Griesmann H, Beitzinger M, Hofmann L, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Hüttinger-Kirchhof N, Oswald C, Friedl P, Gattenlöhner S, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T.2006 p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. *Cancer Cell*. 2006 Oct;10(4):281-93.

Candi E, Schmidt R, Melino G.2005 The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Apr;6(4):328-40. Review.

Cang Y, Zhang J, Nicholas SA, Bastien J, Li B, Zhou P, Goff SP.2006 Deletion of DDB1 in mouse brain and lens leads to p53-dependent elimination of proliferating cells. *Cell*. 2006 Dec 1;127(5):929-40.

Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA.2001 Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9742-7. Epub 2001 Jul 31.

Cardozo T, Pagano M.2004 The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Sep;5(9):739-51. Review.

Castagnoli L, Zucconi A, Quondam M, Rossi M, Vaccaro P, Panni S, Paoluzi S, Santonico E, Dente L, Cesareni G.2001 Alternative bacteriophage display systems. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2001 Apr;4(2):121-33. Review.

Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG, van Bokhoven H.1999

Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*. 1999 Oct 15;99(2):143-53.

Cesareni G, Castagnoli L, Cestra G.1999 Phage displayed peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*. 1999 Feb;2(1):1-17. Review.

Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M.2006 The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):601-13.

Chastagner P, Israël A, Brou C.2006 Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*. 2006 Nov;7(11):1147-53. Epub 2006 Oct 6.

Chen LC, Manjeshwar S, Lu Y, Moore D, Ljung BM, Kuo WL, Dairkee SH, Wernick M, Collins C, Smith HS. The human homologue for the *Caenorhabditis elegans* cul-4 gene is amplified and overexpressed in primary breast cancers. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3677-83.

Chi SW, Ayed A, Arrowsmith CH.1999 Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4438-45.

Ciechanover A.1994 The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994 Oct 7;79(1):13-21. Review.

Ciechanover A.2005 Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ*. 2005 Sep;12(9):1178-90. Review.

Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H, Daxenbichler G, Zeimet A, Zeillinger R, Marth C, Moll UM.2004 Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2449-60.

Concin N, Hofstetter G, Berger A, Gehmacher A, Reimer D, Watrowski R, Tong D, Schuster E, Hefler L, Heim K, Mueller-Holzner E, Marth C, Moll UM, Zeimet AG, Zeillinger R.2005 Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8372-83.

Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG.1999 Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic

leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res.* 1999 Jul 15;59(14):3352-6.

Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C, Levrero M.2002 DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes.*Mol Cell.* 2002 Jan;9(1):175-86.

De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G.1998 Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med.* 1998 Nov 2;188(9):1763-8.

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

De Laurenzi V, Raschellá G, Barcaroli D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Ranalli M, Catani MV, Tanno B, Costanzo A, Levrero M, Melino G.2000 Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):15226-31.

De Laurenzi V, Rossi A, Terrinoni A, Barcaroli D, Levrero M, Costanzo A, Knight RA, Guerrieri P, Melino G.2000 p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 24;273(1):342-6.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ.2000 Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):351-61.

Derry WB, Putzke AP, Rothman JH.2001 *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science.* 2001 Oct 19;294(5542):591-5. Epub 2001 Sep 13.

Deshaies RJ.1999 SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:435-67. Review.

DeYoung MP, Johannessen CM, Leong CO, Faquin W, Rocco JW, Ellisen LW.2006 Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9362-8.

Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C.1999 p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1999 Feb;19(2):1438-49.

Di Fiore PP, Polo S, Hofmann K.2003 When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jun;4(6):491-7. Review.

Dikic I.2003 Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. Biochem Soc Trans. 2003 Dec;31(Pt 6):1178-81. Review.

Domínguez G, García JM, Peña C, Silva J, García V, Martínez L, Maximiano C, Gómez ME, Rivera JA, García-Andrade C, Bonilla F.2006 DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. J Clin Oncol. 2006 Feb 10;24(5):805-15. Epub 2005 Dec 27.

Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, Kaghad M, Blanc E, Raguenez G, Goldschneider D, Terrier-Lacombe MJ, Hartmann O, Moll U, Caput D, Bénard J.2002 DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. Am J Pathol. 2002 Feb;160(2):631-9.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.2001 Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8.

Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C, Hunter T, Copeland N, Jenkins N, Liu YC.2002 Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. Nat Immunol. 2002 Mar;3(3):281-7. Epub 2002 Feb 4.

Fang D, Kerppola TK.2004 Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 12;101(41):14782-7. Epub 2004 Oct 5.

Fang D, Wang HY, Fang N, Altman Y, Elly C, Liu YC.2000 Cbl-b, a RING-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-kinase for ubiquitination in T cells. J Biol Chem. 2001 Feb 16;276(7):4872-8. Epub 2000 Nov 21.

Faridoni-Laurens L, Tourpin S, Alsafadi S, Barrois M, Temam S, Janot F, Koscielny S, Bosq J, Bénard J, Ahomadegbe JC.2008 Involvement of N-terminally truncated variants of p73, deltaTAp73, in head and neck squamous cell cancer: a comparison with p53 mutations. Cell Cycle. 2008 Jun 1;7(11):1587-96. Epub 2008 Mar 2.

Fillippovich I, Sorokina N, Gatei M, Haupt Y, Hobson K, Moallem E, Spring K, Mould M, McGuckin MA, Lavin MF, Khanna KK.2001 Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. Oncogene. 2001 Jan 25;20(4):514-22.

Flinterman M, Guelen L, Ezzati-Nik S, Killick R, Melino G, Tominaga K, Mymryk JS, Gäken J, Tavassoli M.2004 E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. J Biol Chem. 2005 Feb 18;280(7):5945-59. Epub 2004 Nov 29.

Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T. 2005 Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. Cancer Cell. 2005 Apr;7(4):363-73.

Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T.2002 p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. Nature. 2002 Apr 4;416(6880):560-4.

Fontemaggi G, Gurtner A, Strano S, Higashi Y, Sacchi A, Piaggio G, Blandino G.2001The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. Mol Cell Biol. 2001 Dec;21(24):8461-70.

Fulco M, Costanzo A, Merlo P, Mangiacasale R, Strano S, Blandino G, Balsano C, Lavia P, Levrero M.2003 p73 is regulated by phosphorylation at the G2/M transition. J Biol Chem. 2003 Dec 5;278(49):49196-202. Epub 2003 Aug 13.

Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C.2001 A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. Mol Cell Biol. 2001 Mar;21(5):1874-87.

Gaiddon C, Lokshin M, Gross I, Levasseur D, Taya Y, Loeffler JP, Prives C.2003Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73. J Biol Chem. 2003 Jul 25;278(30):27421-31. Epub 2003 Apr 3.

Galan JM, Hagenauer-Tsapis R.1997 Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. EMBO J. 1997 Oct 1;16(19):5847-54.

Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M.2006 Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 7;103(6):1717-22. Epub 2006 Jan 30.

Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M.2004 Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. Science. 2004 Oct 8;306(5694):271-5. Epub 2004 Sep 9.

Geetha T, Jiang J, Wooten MW.2005 Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. Mol Cell. 2005 Oct 28;20(2):301-12.

Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY.1999The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. Nature. 1999 Jun 24;399(6738):806-9.

Gonzalez S, Prives C, Cordon-Cardo C.2003 p73alpha regulation by Chk1 in response to DNA damage. Mol Cell Biol. 2003 Nov;23(22):8161-71.

Green DR, Chipuk JE.2006 p53 and metabolism: Inside the TIGAR. Cell. 2006 Jul 14;126(1):30-2. Review.

Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G, Tobler A.2001 Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. Cell Death Differ. 2001 Dec;8(12):1213-23.

Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, Nakatani Y.2003 The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. Cell. 2003 May 2;113(3):357-67.

Gu J, Chen D, Rosenblum J, Rubin RM, Yuan ZM.2000 Identification of a sequence element from p53 that signals for Mdm2-targeted degradation. Mol Cell Biol. 2000 Feb;20(4):1243-53.

Gupta A, Yang LX, Chen L.2002 Study of the G2/M cell cycle checkpoint in irradiated mammary epithelial cells overexpressing Cul-4A gene. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002 Mar 1;52(3):822-30.

Haas AL, Rose IA.1982 The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. J Biol Chem. 1982 Sep 10;257(17):10329-37.

Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I.2003 Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. Trends Biochem Sci. 2003 Nov;28(11):598-603. Review.

Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I.2003 Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. Nat Cell Biol. 2003 May;5(5):461-6.

Harms K, Nozell S, Chen X.2004 The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. Cell Mol Life Sci. 2004 Apr;61(7-8):822-42. Review.

Harris SL, Levine AJ.2005 The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005 Apr 18;24(17):2899-908. Review.

Hartenstein B, Teurich S, Hess J, Schenkel J, Schorpp-Kistner M, Angel P.2002 Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *EMBO J*. 2002 Dec 2;21(23):6321-9.

Harvey KF, Dinudom A, Komwatana P, Jolliffe CN, Day ML, Parasivam G, Cook DI, Kumar S.1999 All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular Na⁺. *J Biol Chem*. 1999 Apr 30;274(18):12525-30.

Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S.1998 A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol*. 1998 Jun 15;141(6):1415-22.

He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y.2006 DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev*. 2006 Nov 1;20(21):2949-54.

Heissmeyer V, Macián F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML, Rao A.2004 Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol*. 2004 Mar;5(3):255-65. Epub 2004 Feb 15.

Herman-Bachinsky Y, Ryoo HD, Ciechanover A, Gonen H.2007 Regulation of the Drosophila ubiquitin ligase DIAP1 is mediated via several distinct ubiquitin system pathways. *Cell Death Differ*. 2007 Apr;14(4):861-71. Epub 2007 Jan 5.

Hershko A, Ciechanover A.1998 The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79. Review.

Hershko A.1983 Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell*. 1983 Aug;34(1):11-2. Review

Hershko A.2005 The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ*. 2005 Sep;12(9):1191-7. Review.

Hettema EH, Valdez-Taubas J, Pelham HR.2004 Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J*. 2004 Mar 24;23(6):1279-88. Epub 2004 Feb 26.

Hicke L, Dunn R.2003 Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:141-72. Review.

Hicke L.2001 Protein regulation by monoubiquitin. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):195-201. Review.

Higa LA, Banks D, Wu M, Kobayashi R, Sun H, Zhang H.2006 L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. Cell Cycle. 2006 Aug;5(15):1675-80. Epub 2006 Aug 1.

Higa LA, Mihaylov IS, Banks DP, Zheng J, Zhang H.2003 Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. Nat Cell Biol. 2003 Nov;5(11):1008-15. Epub 2003 Oct 26. Erratum in: Nat Cell Biol. 2003 Dec;5(12):1122.

Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H.2006 CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. Nat Cell Biol. 2006 Nov;8(11):1277-83. Epub 2006 Oct 15.

Higa LA, Yang X, Zheng J, Banks D, Wu M, Ghosh P, Sun H, Zhang H.2006 Involvement of CUL4 ubiquitin E3 ligases in regulating CDK inhibitors Dacapo/p27Kip1 and cyclin E degradation. Cell Cycle. 2006 Jan;5(1):71-7. Epub 2006 Jan 21.

Holcakova J, Ceskova P, Hrstka R, Muller P, Dubska L, Coates PJ, Palecek E, Vojtesek B.2008 The cell type-specific effect of TAp73 isoforms on the cell cycle and apoptosis. Cell Mol Biol Lett. 2008;13(3):404-20. Epub 2008 Mar 18.

Honda R, Yasuda H.2000 Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. Oncogene. 2000 Mar 9;19(11):1473-6.

Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A.2005 UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. Oncogene. 2005 Nov 3;24(48):7156-69.

Hu J, McCall CM, Ohta T, Xiong Y.2004 Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. Nat Cell Biol. 2004 Oct;6(10):1003-9. Epub 2004 Sep 26.

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM.1995 A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 28;92(7):2563-7.

Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y.1999 p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. Cell Death Differ. 1999 Dec;6(12):1154-61. Review.

Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG Jr.2000 Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. Nature. 2000 Oct 5;407(6804):645-8.

Irwin MS, Kaelin WG.2001 p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. Cell Growth Differ. 2001 Jul;12(7):337-49. Review.

Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG Jr.2003 Chemosensitivity linked to p73 function. Cancer Cell. 2003 Apr;3(4):403-10.

Irwin MS, Miller FD.2004 p73: regulator in cancer and neural development. Cell Death Differ. 2004 Jul;11 Suppl 1:S17-22

Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T, Ikawa S.2002 Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. Cancer Res. 2002 Feb 1;62(3):636-41.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr.2001 HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science. 2001 Apr 20;292(5516):464-8. Epub 2001 Apr 5.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ.2001 Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science. 2001 Apr 20;292(5516):468-72. Epub 2001 Apr 5.

Jia S, Kobayashi R, Grewal SI.2005 Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. Nat Cell Biol. 2005 Oct;7(10):1007-13. Epub 2005 Aug 28.

Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC.2006 A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. Mol Cell. 2006 Sep 1;23(5):709-21.

Joazeiro CA, Weissman AM.2000 RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. Cell. 2000 Sep 1;102(5):549-52. Review.

Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A.1995 A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. J Biol Chem. 1995 Jul 21;270(29):17442-56.

Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, Kumar S.2000 Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. Biochem J. 2000 Nov 1;351 Pt 3:557-65.

Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr.1997 p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. Nature. 1997 Sep 11;389(6647):191-4. Erratum in: Nature 1999 Jun 24;399(6738):817.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D.1997 Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell. 1997 Aug 22;90(4):809-19.

Kamura T, Conrad MN, Yan Q, Conaway RC, Conaway JW.1999 The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. Genes Dev. 1999 Nov 15;13(22):2928-33.

Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR.2004 Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. Mol Cell. 2004 May 21;14(4):491-500.

Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD.2002 Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Dec;3(12):893-905. Review

Kawakami T, Chiba T, Suzuki T, Iwai K, Yamanaka K, Minato N, Suzuki H, Shimbara N, Hidaka Y, Osaka F, Omata M, Tanaka K.2001 NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. EMBO J. 2001 Aug 1;20(15):4003-12.

Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP.1999 Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. Blood. 1999 Aug 1;94(3):1113-20.

Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ.2001 Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. Science. 2001 Oct 5;294(5540):173-7. Epub 2001 Aug 30.

Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, LaQuaglia M, Moll UM.1998 Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. Cell Growth Differ. 1998 Nov;9(11):897-903.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP.1996Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science. 1996 Nov 8;274(5289):948-53.

Lee CW, La Thangue NB.1999 Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73. Oncogene. 1999 Jul 22;18(29):4171-81.

Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y.1999 Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. Mol Cell. 1999 Dec;4(6):1029-40.

Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G.2000 The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J Cell Sci. 2000 May;113 (Pt 10):1661-70. Review.

Li B, Ruiz JC, Chun KT.2002 CUL-4A is critical for early embryonic development.Mol Cell Biol. 2002 Jul;22(14):4997-5005.

Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA.1999 Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. EMBO J. 1999 Jan 15;18(2):420-32.

Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W.2003 Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. Science. 2003 Dec 12;302(5652):1972-5.

Lissy NA, Davis PK, Irwin M, Kaelin WG, Dowdy SF.2000 A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. Nature. 2000 Oct 5;407(6804):642-5.

Liu J, Furukawa M, Matsumoto T, Xiong Y.2002 NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. Mol Cell. 2002 Dec;10(6):1511-8.

Liu SS, Chan KY, Leung RC, Law HK, Leung TW, Ngan HY.2006 Enhancement of the radiosensitivity of cervical cancer cells by overexpressing p73alpha. Mol Cancer Ther. 2006 May;5(5):1209-15.

Maisse C, Munarriz E, Barcaroli D, Melino G, De Laurenzi V.2004 DNA damage induces the rapid and selective degradation of the DeltaNp73 isoform, allowing apoptosis to occur. Cell Death Differ. 2004 Jun;11(6):685-7. No abstract available.

Mantovani F, Piazza S, Gostissa M, Strano S, Zacchi P, Mantovani R, Blandino G, Del Sal G.2004 Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. Mol Cell. 2004 Jun 4;14(5):625-36.

Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr.2000 A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. Nat Genet. 2000 May;25(1):47-54.

Marmor MD, Yarden Y.2004 Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. Oncogene. 2004 Mar 15;23(11):2057-70. Review.

Martin C, Zhang Y.2005 The diverse functions of histone lysine methylation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Nov;6(11):838-49. Review.

Mashima T, Tsuruo T.2005 Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. Drug Resist Updat. 2005 Dec;8(6):339-43. Epub 2005 Dec 9. Review

Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH.2004 p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. J Biol Chem. 2004 Feb 27;279(9):8076-83. Epub 2003 Nov 21.

Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH.2002 p73: Friend or foe in tumorigenesis. Nat Rev Cancer. 2002 Aug;2(8):605-15. Review.

Michael D, Oren M.2002 The p53 and Mdm2 families in cancer. Curr Opin Genet Dev. 2002 Feb;12(1):53-9. Review.

Miller FD, Pozniak CD, Walsh GS.2000 Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. Cell Death Differ. 2000 Oct;7(10):880-8. Review.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A.1999 p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature. 1999 Apr 22;398(6729):708-13.

Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D.2000 Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. J Biol Chem. 2000 Nov 17;275(46):36316-23.

Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A.2003 A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2,

stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 15;308(1):106-13. *Mol Cell.* 1998 Sep;2(3):305-16.

Moll UM, Petrenko O.2003 The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 2003 Dec;1(14):1001-8. Review.

Moll UM, Slade N.2004 p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2004 Jul;2(7):371-86. Review.

Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A.2006 The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem.* 2006 Dec 15;281(50):38738-47. Epub 2006 Oct 12.

Mueller DL.2004 E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol.* 2004 Sep;5(9):883-90. Review.

Munarriz E, Barcaroli D, Stephanou A, Townsend PA, Maisse C, Terrinoni A, Neale MH, Martin SJ, Latchman DS, Knight RA, Melino G, De Laurenzi V.2004 PIAS-1 is a checkpoint regulator which affects exit from G1 and G2 by sumoylation of p73. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10593-610.

Muratani M, Tansey WP.2003 How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Mar;4(3):192-201. Review.

Murillas R, Simms KS, Hatakeyama S, Weissman AM, Kuehn MR.2002 Identification of developmentally expressed proteins that functionally interact with Nedd4 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2002 Jan 25;277(4):2897-907. Epub 2001 Nov 20.

Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC.2006 p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;13(6):962-72. Review.

Musti AM, Treier M, Bohmann D.1997 Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science.* 1997 Jan 17;275(5298):400-2.

Nag A, Bagchi S, Raychaudhuri P.2004 Cul4A physically associates with MDM2 and participates in the proteolysis of p53. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8152-5.

Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe Ki K, Todo S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawara A.2002 Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2575-85.

- Nakano K, Bálint E, Ashcroft M, Vousden KH.2000 A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene*. 2000 Aug 31;19(37):4283-9.
- Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W.2003 Parc: a cytoplasmic anchor for p53.*Cell*. 2003 Jan 10;112(1):29-40.
- Nishikawa H, Ooka S, Sato K, Arima K, Okamoto J, Klevit RE, Fukuda M, Ohta T.2004Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):3916-24. Epub 2003 Nov 24.
- Nishitani H, Sugimoto N, Roukos V, Nakanishi Y, Saijo M, Obuse C, Tsurimoto T, Nakayama KI, Nakayama K, Fujita M, Lygerou Z, Nishimoto T.2006 Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J*. 2006 Mar 8;25(5):1126-36. Epub 2006 Feb 16.
- Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi T, Takahashi T.1998 Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res*. 1998 Apr 1;58(7):1380-3.
- Oberst A, Malatesta M, Aqeilan RI, Rossi M, Salomoni P, Murillas R, Sharma P, Kuehn MR, Oren M, Croce CM, Bernassola F, Melino G.2007 The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11280-5. Epub 2007 Jun 25.
- Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, Xiong Y.1999 ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*. 1999 Apr;3(4):535-41.
- Oliver PM, Cao X, Worthen GS, Shi P, Briones N, MacLeod M, White J, Kirby P, Kappler J, Marrack P, Yang B.2006 Ndfip1 protein promotes the function of itch ubiquitin ligase to prevent T cell activation and T helper 2 cell-mediated inflammation.*Immunity*. 2006 Dec;25(6):929-40. Epub 2006 Nov 30.
- Ollmann M, Young LM, Di Como CJ, Karim F, Belvin M, Robertson S, Whittaker K, Demsky M, Fisher WW, Buchman A, Duyk G, Friedman L, Prives C, Kopczynski C.2000 *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*. 2000 Mar 31;101(1):91-101.
- Ongkeko WM, Wang XQ, Siu WY, Lau AW, Yamashita K, Harris AL, Cox LS, Poon RY.1999 MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Curr Biol*. 1999 Jul 29-Aug 12;9(15):829-32.

Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S.1998 Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. Nat Med. 1998 Jul;4(7):839-43. Erratum in: Nat Med 1998 Sep;4(9):982.

Osaka F, Saeki M, Katayama S, Aida N, Toh-E A, Kominami K, Toda T, Suzuki T, Chiba T, Tanaka K, Kato S.2000 Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3475-84.

Osborn MT, Chambers TC.1996Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs.J Biol Chem. 1996 Nov 29;271(48):30950-5.

Osley MA, Fleming AB, Kao CF.2006 Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. Results Probl Cell Differ. 2006;41:47-75. Review.

Oswald C, Stiewe T.2008 In good times and bad: p73 in cancer. Cell Cycle. 2008 Jun 15;7(12):1726-31. Epub 2008 Jun 16. Review.

Oswald C, Stiewe T.2008 In good times and bad: p73 in cancer. Cell Cycle. 2008 Jun 15;7(12):1726-31. Epub 2008 Jun 16. Review.

Ozaki T, Naka M, Takada N, Tada M, Sakiyama S, Nakagawara A.1999 Deletion of the COOH-terminal region of p73alpha enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. Cancer Res. 1999 Dec 1;59(23):5902-7.

Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG.1998 The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. Nat Genet. 1998 Feb;18(2):143-6.

Petrenko O, Zaika A, Moll UM.2003 deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(16):5540-55.

Petrenko O, Zaika A, Moll UM.2003 deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(16):5540-55.

Petroski MD, Deshaies RJ.2005 Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jan;6(1):9-20. Review.

Pickart CM, Fushman D.2004 Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. Curr Opin Chem Biol. 2004 Dec;8(6):610-6. Review.

Pickart CM.2001 Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem. 2001;70:503-33. Review.

Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M.2003 The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. Nature. 2003 Sep 18;425(6955):311-6. Epub 2003 Sep 3.

Podust VN, Brownell JE, Gladysheva TB, Luo RS, Wang C, Coggins MB, Pierce JW, Lightcap ES, Chau V.2000 A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4579-84.

Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD.2000 An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death.Science. 2000 Jul 14;289(5477):304-6.

Pützer BM, Tuve S, Tannapfel A, Stiewe T.2003 Increased DeltaN-p73 expression in tumors by upregulation of the E2F1-regulated, TA-promoter-derived DeltaN'-p73 transcript. Cell Death Differ. 2003 May;10(5):612-4

Rao N, Miyake S, Reddi AL, Douillard P, Ghosh AK, Dodge IL, Zhou P, Fernandes ND, Band H.2002 Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3794-9

Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, Hottelet M, Parent LA, Coggins MB, Pierce JW, Podust VN, Luo RS, Chau V, Palombella VJ.2000 Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta(TrCP))-dependent ubiquitination of IkappaBalpha. Mol Cell Biol. 2000 Apr;20(7):2326-33.

Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW.2006 p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. Cancer Cell. 2006 Jan;9(1):45-56.

Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA, Croce CM, Melino G.2006 The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 22;103(34):12753-8. Epub 2006 Aug 14.

Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G.2005 The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. EMBO J. 2005 Feb 23;24(4):836-48. Epub 2005 Jan 27.

Rossi M, De Simone M, Pollice A, Santoro R, La Mantia G, Guerrini L, Calabrò V.2006Itch/AIP4 associates with and promotes p63 protein degradation. Cell Cycle. 2006 Aug;5(16):1816-22. Epub 2006 Aug 15.

Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X.2001 ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. Mol Cell. 2001 Oct;8(4):781-94.

Scheffner M, Staub O.2007 HECT E3s and human disease. BMC Biochem. 2007 Nov 22;8 Suppl 1:S6. Review

Schmale H, Bamberger C.1997 A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. Oncogene. 1997 Sep;15(11):1363-7.

Schnell JD, Hicke L.2003 Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):35857-60. Epub 2003 Jul 14. Review.

Scialpi F, Malatesta M, Peschiaroli A, Rossi M, Melino G, Bernassola F.2008 Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. Biochem Pharmacol. 2008 Jul 31.

Seelan RS, Irwin M, van der Stoop P, Qian C, Kaelin WG Jr, Liu W.2002 The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites.Neoplasia. 2002 May-Jun;4(3):195-203.

Shiyanov P, Nag A, Raychaudhuri P.1999 Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. J Biol Chem. 1999 Dec 10;274(50):35309-12.

Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, Conrad MN, Conaway RC, Conaway JW, Elledge SJ, Harper JW.1999 Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. Science. 1999 Apr 23;284(5414):662-5.

Slade N, Zaika AI, Erster S, Moll UM.2004 DeltaNp73 stabilises TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. Cell Death Differ. 2004 Mar;11(3):357-60.

Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D.1997Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. EMBO J. 1997 Nov 3;16(21):6325-36.

Steegenga WT, Shvarts A, Riteco N, Bos JL, Jochemsen AG.1999 Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus E1A, E1B, and E4orf6 proteins. Mol Cell Biol. 1999 May;19(5):3885-94.

Stiewe T, Pützer BM.2000 Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4):464-9.

Stiewe T, Pützer BM.2002 Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ.* 2002 Mar;9(3):237-45. Review.

Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM.2002 Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):14177-85. Epub 2002 Feb 13.

Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Pützer BM.2002 Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3598-602.

Strano S, Munarriz E, Rossi M, Cristofanelli B, Shaul Y, Castagnoli L, Levine AJ, Sacchi A, Cesareni G, Oren M, Blandino G.2000 Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29503-12.

Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F.2005 UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell.* 2005 May 6;121(3):387-400.

Sundvall M, Korhonen A, Paatero I, Gaudio E, Melino G, Croce CM, Aqeilan RI, Elenius K.2008 Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 18;105(11):4162-7. Epub 2008 Mar 11.

Takata K, Yoshida H, Yamaguchi M, Sakaguchi K.2004 Drosophila damaged DNA-binding protein 1 is an essential factor for development. *Genetics.* 2004 Oct;168(2):855-65.

Terrell J, Shih S, Dunn R, Hicke L.1998 A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell.* 1998 Jan;1(2):193-202.

Thanos CD, Bowie JU.1999 p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci.* 1999 Aug;8(8):1708-10.

Thien CB, Langdon WY.2001 Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr;2(4):294-307. Review.

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM.2000 Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000 Jan 4;19(1):94-102.

Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS, Iovanna JL, Squire J, Jurisica I, Kaplan D,

Melino G, Jurisicova A, Mak TW.2008 TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. Genes Dev. 2008 Oct 1;22(19):2677-91. Epub 2008 Sep 19.

Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D.1998 A new human p53 homologue. Nat Med. 1998 Jul;4(7):747-8. No abstract available. Erratum in: Nat Med 1998 Sep;4(9):982.

Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, Pavletich NP, Carver BS, Cordon-Cardo C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chi SG, Kim HJ, Misteli T, Jiang X, Pandolfi PP.2007 Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. Cell. 2007 Jan 12;128(1):141-56.

Tsao H, Zhang X, Majewski P, Haluska FG.1999 Mutational and expression analysis of the p73 gene in melanoma cell lines. Cancer Res. 1999 Jan 1;59(1):172-4.

Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Laurenzi VD, Huegli B, Kreuzer KA, Schmidt CA, Melino G, Fey MF, Tobler A, Cajot JF.2000 Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 14;277(1):62-5.

Tsvetkov P, Asher G, Reiss V, Shaul Y, Sachs L, Lotem J.2005 Inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 12;102(15):5535-40. Epub 2005 Apr 4.

Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, Shimotohno K.1999 New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. Oncogene. 1999 Sep 2;18(35):4993-8.

Ulane CM, Horvath CM.2002Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components. Virology. 2002 Dec 20;304(2):160-6.

Uramoto H, Izumi H, Ise T, Tada M, Uchiumi T, Kuwano M, Yasumoto K, Funa K, Kohno K.2002 p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. J Biol Chem. 2002 Aug 30;277(35):31694-702. Epub 2002 Jun 21.

Urist M, Tanaka T, Poyurovsky MV, Prives C.2004 p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. Genes Dev. 2004 Dec 15;18(24):3041-54.

Varadan R, Assfalg M, Haririnia A, Raasi S, Pickart C, Fushman D.2004 Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional

diversity of polyubiquitin signaling. J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8):7055-63. Epub 2003 Nov 25.

Varadan R, Walker O, Pickart C, Fushman D.2002 Structural properties of polyubiquitin chains in solution. J Mol Biol. 2002 Dec 6;324(4):637-47.

Vossio S, Palescandolo E, Pediconi N, Moretti F, Balsano C, Levrero M, Costanzo A.2002 DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. Oncogene. 2002 May 23;21(23):3796-803.

Vousden KH.2000 p53: death star. Cell. 2000 Nov 22;103(5):691-4. Review.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ.2001 TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature. 2001 Jul 19;412(6844):346-51.

Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y.2006 Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. Mol Cell. 2006 May 5;22(3):383-94.

Watanabe K, Ozaki T, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Hosoda M, Hayashi S, Todo S, Nakagawara A.2002 Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):15113-23. Epub 2002 Feb 13.

Weissman AM.2001 Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):169-78. Review.

Wertz IE, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, Dixit VM.2004 Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. Science. 2004 Feb 27;303(5662):1371-4. Epub 2004 Jan 22.

Wilkinson KD.2000 Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. Semin Cell Dev Biol. 2000 Jun;11(3):141-8. Review.

Wu K, Chen A, Pan ZQ.2000 Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. J Biol Chem. 2000 Oct 13;275(41):32317-24.

Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, Vidal M, Elledge SJ, Harper JW.2003 BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. Nature. 2003 Sep 18;425(6955):316-21. Epub 2003 Sep 3.

Yamasaki S, Takamatsu M, Iwashima M.1996 The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization. Mol Cell Biol. 1996 Dec;16(12):7151-60.

Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F.2002 On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. Trends Genet. 2002 Feb;18(2):90-5. Review.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F.1998 p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Mol Cell. 1998 Sep;2(3):305-16.

Yang A, McKeon F.2000 P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Dec;1(3):199-207. Review.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F.1999 p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature. 1999 Apr 22;398(6729):714-8.

Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D.2000 p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature. 2000 Mar 2;404(6773):99-103.

Yang C, Zhou W, Jeon MS, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, Liu YC.2006 Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. Mol Cell. 2006 Jan 6;21(1):135-41.

Yasui K, Arai S, Zhao C, Imoto I, Ueda M, Nagai H, Emi M, Inazawa J.2002 TFDP1, CUL4A, and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas. Hepatology. 2002 Jun;35(6):1476-84.

Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, Iwai K, Tanaka K, Tai T.2003 Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. J Biol Chem. 2003 Oct 31;278(44):43877-84. Epub 2003 Aug 25

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B.1999 Identification and classification of p53-regulated genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7;96(25):14517-22.

Yu ZK, Gervais JL, Zhang H.1998 Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 15;95(19):11324-9.

Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D.1999 p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):814-7

Zachariae W, Schwab M, Nasmyth K, Seufert W.1998 Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*. 1998 Nov 27;282(5394):1721-4.

Zaika A, Irwin M, Sansome C, Moll UM.2000 Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;276(14):11310-6. Epub 2000 Dec 13.

Zaika AI, Kovalev S, Marchenko ND, Moll UM.1999 Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res*. 1999 Jul 1;59(13):3257-63.

Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E, Moll UM.2002 DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*. 2002 Sep 16;196(6):765-80.

Zeng X, Chen L, Jost CA, Maya R, Keller D, Wang X, Kaelin WG Jr, Oren M, Chen J, Lu H.1999 MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3257-66.

Zeng X, Zhu Y, Lu H.2001 NBP is the p53 homolog p63. *Carcinogenesis*. 2001 Feb;22(2):215-9.

Zheng J, Yang X, Harrell JM, Ryzhikov S, Shim EH, Lykke-Andersen K, Wei N, Sun H, Kobayashi R, Zhang H.2002 CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell*. 2002 Dec;10(6):1519-26.

Zhong W, Feng H, Santiago FE, Kipreos ET.2003 CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature*. 2003 Jun 19;423(6942):885-9.

Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X.1998 The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5061-5.

CURRICULUM VITAE

Martina Malatesta

Personal data:

- **Citizenship:** Italian
- **Date of birth:** 24/05/1979
- **Place of birth:** Rome
- **Residence:** Viale Carso n° 1 Rome Italy
- **E-mail:** martinamalatesta@hotmail.com
- **Telephone:** home: +39-063700032; work: +39-72596453; cell: +39-3383696295

Present position:

- **Since November 2005:** Ph.D student in “Medical Biotechnology and Experimental Medicine” at University of Rome “Tor Vergata” Italy. Thesis advisor: Prof. Gerry Melino.

Education:

- **July 1997:** High school degree in scientific studies
- **November 2004:** Graduation cum laude in Biological Sciences. Experimental thesis: “The regulation of iron efflux in glial cells by genistein”

Scientific Experiences:

- **November 2000 – November 2002:** Undergraduate research student CISDiC Chemical Center, University of Rome “Roma Tre”, Italy
- **January 2003 – March 2004:** Undergraduate research student. Faculty of Biological Sciences, University of Rome “Roma Tre”, Italy. Advisor: Prof. Marco Colasanti, Regulation of ceruloplasmine and ferroportin by genisteine and induction of iron efflux in glial cells.
- **April 2005 – present:** Ph.D student. Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, University of Rome “Tor Vergata”, Italy. Advisor: Prof. Gerry Melino. Ubiquitin-dependent regulation of the p53 family member, p73.
- **January 2006 – April 2006:** Visiting Ph.D student at MRC Medical Research Council, Toxicology Unit, Leicester University, UK.

Publications:

- A. Oberst*, **M. Malatesta***, R.I. Aqeilan, M. Rossi, P. Salomoni, R. Murillas, P. Sharma, M.R. Kuehn, M. Oren, C.M. Croce, F. Bernassola, G. Melino. "The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch". Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 3;104(27):11280-5.

*Co-first authors

- G. Melino, E. Gallagher, R.I. Aqeilan, R. Knight, A. Peschiaroli, M. Rossi, F. Scialpi, **M. Malatesta**, L. Zocchi, G. Browne, A. Ciechanover, F. Bernassola. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. Cell Death Differ. 2008 Jul;15(7):1103-12. Review.
- F. Scialpi, **M. Malatesta**, A. Peschiaroli, M. Rossi, G. Melino, F. Bernassola. Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. Biochem Pharmacol. 2008 Jul 31.

Manuscripts in preparation:

- **M. Malatesta**, A. Peschiaroli, P. Zhou, F. Bernassola, G. Melino. The Cullin4a/DDB-1/Roc1 E3 ubiquitin ligase represses p73 transcriptional activity.

Abstracts:

- G. Musci, T. Persichini, **M. Malatesta**, M.C. Bonaccorsi di Patti, T. Maio, A. Lania, V. Mazzone, F. Polticelli, M. Colasanti "The isoflavone genisteine induces iron efflux from glial cells, C6, transactivating ceruloplasmine and ferroportin" 65° UZI Congress, Taormina September 2004.
- F. Bernassola, A. Oberst, **M. Malatesta**, M. Rossi, P. Salomoni, R. Murillas, P. Sharma, M. Kuehn, R. Aqeilan, C. Croce, M. Oren and G. Melino "The Nedd4 Binding Partner 1 (N4BP1) protein is a novel inhibitor of the E3 ligase Itch" 3rd International p63/p73 workshop, Rome, Italy March 2007
- **M. Malatesta**, F. Bernassola, G. Melino. "N4BP1: a novel negative regulator of the HECT-type E3 ubiquitin ligase Itch" Fifth Tuscany Retreat on Cancer Research "Genetic profiling, resistance mechanism and novel treatment concepts in cancer" Sarteano-Siena, Tuscany, Italy August 2007.

Technical experience:

- Tissue Culture: Mammalian adherent cell culture, transfections; RNA interference through siRNA and lentiviral infections; adenoviral amplifications and infections.
- Molecular Genetics: Genomic DNA isolation, subcloning, DNA and RNA

extraction and purification, prokaryotic cell transformation; DNA amplification by PCR; RT-PCR; Real time PCR; agarose electrophoresis.

- Biochemistry: Protein analysis by Western blotting; immunoprecipitation; immunofluorescence on tissues and cells; ELISA; acrylamide electrophoresis; protein purification; in vitro ubiquitination assay.
- Animal work: Isolation of mouse tissues and establishment of primary cell cultures, harvesting of mouse embryos, genotyping of mouse colonies.

Language skills:

Proficient knowledge of spoken and written English

References:

- **Prof. Gerry Melino**
Department of Experimental Medicine
University of Rome "Tor Vergata"
Via Montpellier,1
00133 Rome, Italy
tel. office: +39 -06-72596976 fax: +39-06-20427290
E-mail: gerry.melino@uniroma2.it
- **Dr. Francesca Bernassola**
Department of Experimental Medicine
University of Rome "Tor Vergata"
Via Montpellier,1
00133 Rome, Italy
tel. office: +39 -06-72596469 fax: +39-06-20427290
E-mail: bernasso@uniroma2.it
- **Prof. Marco Colasanti**
Department of Biology
University of Rome "Roma Tre"
Viale Guglielmo Marconi 446
00146 Rome, Italy
tel. office: +39-06-57336366 fax : +39-06-57336321
E-mail: colasant@uniroma3.it

PUBBLICAZIONI

The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch

Andrew Oberst*, Martina Malatesta*, Rami I. Aqeilan†, Mario Rossi‡, Paolo Salomoni‡, Rodolfo Murillas§, Prashant Sharma¶, Michael R. Kuehn¶, Moshe Oren||, Carlo M. Croce***, Francesca Bernassola*††, and Gerry Melino**

*Biochemistry Laboratory, Istituto Dermopatico dell'Immacolata-Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, University of Rome "Tor Vergata," 00133 Rome, Italy; †Department of Molecular Virology, Immunology, and Medical Genetics, Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, Columbus, OH 43210; ‡Toxicology Unit, Medical Research Council, University of Leicester, Leicester LE1 9HN, United Kingdom; §Department of Molecular and Cellular Biology, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas, 28040 Madrid, Spain; ¶Laboratory of Protein Dynamics and Signaling, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702; and ||Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, 300 Herzl Street, Rehovot 76100, Israel

Edited by Webster K. Cavenee, University of California at San Diego School of Medicine, La Jolla, CA, and approved May 17, 2007 (received for review February 26, 2007)

Nedd4-binding partner-1 (N4BP1) has been identified as a protein interactor and a substrate of the homologous to E6AP C terminus (HECT) domain-containing E3 ubiquitin-protein ligase (E3), Nedd4. Here, we describe a previously unrecognized functional interaction between N4BP1 and Itch, a Nedd4 structurally related E3, which contains four WW domains, conferring substrate-binding activity. We show that N4BP1 association with the second WW domain (WW2) of Itch interferes with E3 binding to its substrates. In particular, we found that N4BP1 and p73 α , a target of Itch-mediated ubiquitin/proteasome proteolysis, share the same binding site. By competing with p73 α for binding to the WW2 domain, N4BP1 reduces the ability of Itch to recruit and ubiquitylate p73 α and inhibits Itch autoubiquitylation activity both in *in vitro* and *in vivo* ubiquitylation assays. Similarly, both c-Jun and p63 polyubiquitylation by Itch are inhibited by N4BP1. As a consequence, genetic and RNAi knockdown of N4BP1 diminish the steady-state protein levels and significantly impair the transcriptional activity of Itch substrates. Notably, stress-induced induction of c-Jun was impaired in N4BP1^{-/-} cells. These results demonstrate that N4BP1 functions as a negative regulator of Itch. In addition, because inhibition of Itch by N4BP1 results in the stabilization of crucial cell death regulators such as p73 α and c-Jun, it is conceivable that N4BP1 may have a role in regulating tumor progression and the response of cancer cells to chemotherapy.

p53 | protein-protein interaction | transcription | ubiquitylation | WW domain

The conjugation of ubiquitin to protein substrates has emerged as a fundamental mechanism for regulation of many cellular activities. The specificity of the ubiquitylation reaction is conferred by the E3 ubiquitin-protein ligases (E3s), which mediate the transfer of the ubiquitin molecule from E2 ubiquitin-conjugating enzymes (E2) to substrates. Ubiquitylation controls turnover and abundance of proteins by targeting them for proteasomal or lysosomal degradation (1–4).

HECT (homologous to E6AP C terminus) domain-containing proteins are a major class of E3s, sharing a common general modular structure, with a Ca²⁺/lipid-binding (C2) domain involved in membrane targeting, multiple WW protein-interacting modules conferring substrate binding activity, and a HECT domain, coordinating with the E2 and providing the catalytic E3 activity (5). The reaction cycle of the HECT domain-containing E3s consists of three steps: binding to an E2 enzyme, loading the ubiquitin on themselves, and transferring ubiquitin to the target protein (1). The prototype member of the HECT family of E3 is Nedd4, mainly implicated in the regulation of fluid and electrolyte homeostasis by controlling the surface abundance of the epithelial cell sodium channel (ENaC) subunits (6, 7).

By carrying out a yeast two-hybrid screen of a midgestation mouse embryo cDNA library, we have recently identified

Nedd4-binding partner-1 (N4BP1) as a developmentally expressed protein interactor and monoubiquitylation substrate of Nedd4 (8). We now know that N4BP1 can also undergo Nedd4-mediated polyubiquitylation and proteasomal degradation (P. Sharma and M.R.K., unpublished manuscript).

The HECT E3 Itch was originally identified as a gene disrupted in the non-agouti-lethal 18H mice, or *Itchy* mice, which suffer from severe immune and inflammatory defects (9). A number of Itch targets are central players or regulators of the immune response, including c-Jun and JunB (10, 11).

Itch E3 activity is also required for ubiquitylation and proteasomal degradation of p73 and p63 (12, 13), two structural homologues of the tumor-suppressor transcription factor p53. The p73 and p63 gene loci encode for several distinct isoforms generated by C-terminal alternative splicing (14) or through the usage of an alternative promoter (ΔN variants) (15). Itch-mediated regulation of p73 and p63 protein stability is selective for those isoforms containing the C-terminal proline-rich motif, such as the α - and β -variants (12, 13).

Of note, several Itch targets are proapoptotic molecules displaying tumor-suppressive functions. The p53 family members and c-Jun promote apoptosis in response to genotoxic stress, such as alkylating agents or short-wavelength UV radiation (16–18).

Itch-negative regulators have remained elusive. In this paper, we show that N4BP1 binds to the WW domains of Itch and inhibits its ubiquitylation activity. As a consequence, N4BP1 stabilizes the Itch targets p73 α and c-Jun and increases their transcriptional activity.

Results

N4BP1 Interacts with the WW Domain-Containing Central Region of Itch. Given the common modular architecture shared by the HECT E3s, the interaction of Nedd4 and N4BP1 prompted us

Author contributions: A.O. and M.M. contributed equally to this work; F.B. and G.M. designed research; A.O., M.M., M.R., and P. Sharma performed research; A.O., M.M., R.I.A., P. Salomoni, R.M., M.R.K., and M.O. contributed new reagents/analytic tools; A.O., M.M., R.I.A., P. Salomoni, M.O., C.M.C., F.B., and G.M. analyzed data; and C.M.C., F.B., and G.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: C2, Ca²⁺/lipid-binding; E3, E3 ubiquitin-protein ligase; HECT, homologous to E6AP C terminus; IB, immunoblot analysis; IP, immunoprecipitation; MEF, mouse embryonic fibroblast; N4BP1, Nedd4-binding partner-1; WWn, WW domain n.

††To whom correspondence may be addressed at: Biochemistry Laboratory, Istituto Dermopatico dell'Immacolata-Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Room F-nord169, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome "Tor Vergata," 00133 Rome, Italy. E-mail: bernasso@uniroma2.it.

**To whom correspondence may be addressed at: Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, Wiseman Hall, Room 385K, 400 West 12th Avenue, Columbus, OH 43210. E-mail: carlo.croce@osumc.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0701773104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

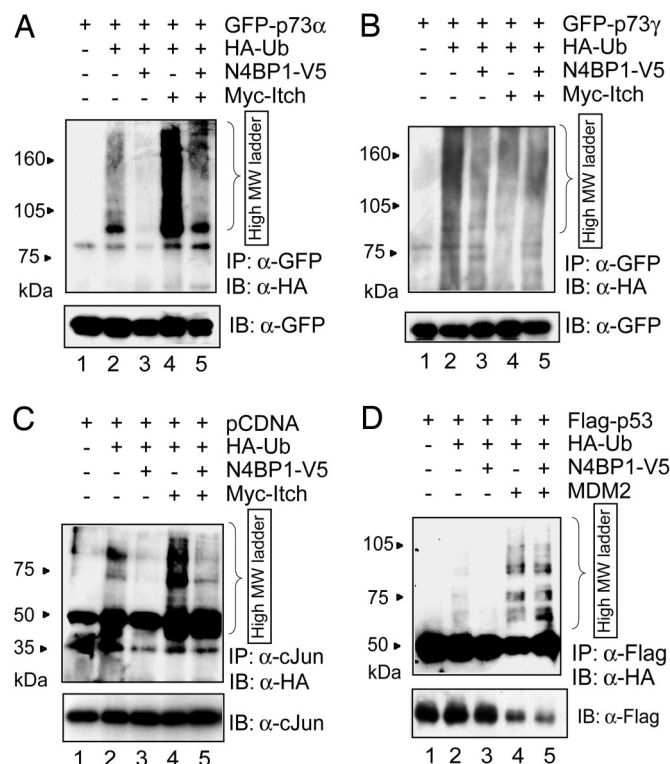


Fig. 2. N4BP1 selectively inhibits ubiquitylation of Itch substrates. H1299 cells were transfected with GFP-p73 α (A), GFP-p73 γ (B), pCDNA empty vector (C), or Flag-p53 (D), along with HA-tagged ubiquitin (HA-Ub), their specific E3, Itch (A–C), or MDM2 (D) in the absence or presence of N4BP1. Twenty-four hours later, cells were treated with 40 μ M proteasome inhibitor MG-132 for 1 h before harvesting. Cell lysates were subjected to IP with anti-GFP (A and B), anti-c-Jun (C), or anti-Flag (D) antibodies under denaturing conditions. Substrate-ubiquitin immunocomplexes were analyzed by anti-HA IB analysis and subsequently probed with anti-GFP (A and B), anti-c-Jun (C), or anti-Flag antibodies (D).

Ablation of N4BP1 Increases Protein Levels and Transcriptional Activity of Itch Protein Substrates. We then investigated whether N4BP1 would affect p73 α and c-Jun protein levels. Overexpression of N4BP1 promoted the accumulation of p73 α as well as of endogenous c-Jun protein levels (SI Fig. 7). In addition, N4BP1 increased their half-life from $\approx$ 6 to $>$ 9 h and from 2 to 5 h for p73 and c-Jun, respectively (SI Fig. 7). Unlike p73 α and consistent with an Itch-dependent mechanism, the decay rate of p53 (SI Fig. 7) and p73 γ (SI Fig. 8) was unaffected by N4BP1.

We next sought to determine the contribution of endogenous N4BP1 to the regulation of Itch substrate protein stability. We recently have generated N4BP1 knockout mice (R.M. and M.R.K., unpublished manuscript) and have isolated primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from N4BP1 $^{-/-}$ mutants for this study. N4BP1 loss indeed significantly diminished p73 endogenous protein levels in MEFs (Fig. 3A). In keeping with the results shown in Fig. 2D, p53 protein levels were essentially unaltered in N4BP1 $^{-/-}$ MEFs compared with their wild-type counterpart.

JNK-mediated phosphorylation of c-Jun prevents its ubiquitin-dependent degradation, thus contributing to its transcriptional activation after cellular stress, such as UV irradiation (24). Interestingly, we found that UV-induced stabilization of c-Jun was significantly hampered in N4BP1 $^{-/-}$ MEFs (Fig. 3B).

Similarly, RNAi-mediated knockdown of N4BP1 in human cells, by using two different siRNA oligos, resulted in decreased expression of p73 (Fig. 3C and data not shown) and Jun family members, at both steady state and after UV irradiation (Fig. 3D and data not

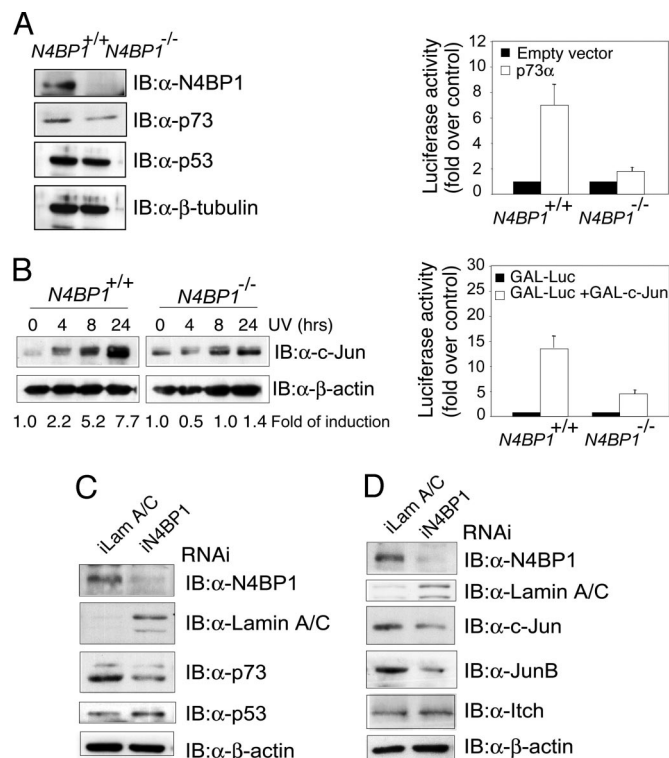
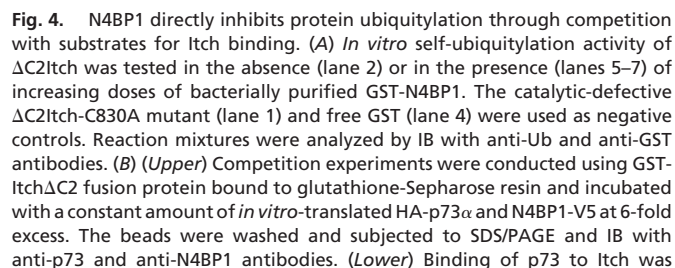


Fig. 3. Genetic and RNAi-mediated knockdown of N4BP1 diminish protein levels and transcriptional activation of Itch substrates. (A) Cell extracts from N4BP1 $^{+/+}$ and N4BP1 $^{-/-}$ MEFs were examined by IB using anti-p73 and anti-p53 antibodies. The same blots were reprobed with anti-N4BP1 and anti- β -tubulin antibodies. (B) N4BP1 $^{+/+}$ and N4BP1 $^{-/-}$ MEFs were UV-treated (60 J/m 2) and lysed at 0, 4, 8, and 24 h after irradiation. Total extracts were probed with anti-c-Jun and anti- β -actin antibodies. Levels of c-Jun are represented as fold of induction over untreated controls. (A and B) Transcriptional activation of p73 α (A) and c-Jun (B) in N4BP1 $^{+/+}$ and N4BP1 $^{-/-}$ MEFs was measured as described in SI Methods. (C and D) HCT-116 (3) cells were transfected with control Lamin A/C or N4BP1 (N4BP1.3 HP) siRNAs. Cells were harvested 72 h after transfection. Cellular lysates were analyzed by IB using anti-p73 and anti-p53 (C) or anti-c-Jun and anti-JunB antibodies (D). Lamin A/C and β -actin are shown as transfection and loading control, respectively.

shown). Altogether, these observations demonstrate that suppression of endogenous N4BP1 promotes increased ubiquitylation and protein degradation of Itch substrates.

In keeping with these findings, we observed that transcriptional activation of p73 α and c-Jun was impaired in both N4BP1 $^{-/-}$ MEFs (Fig. 3A and B) and human cells upon RNAi-mediated silencing of N4BP1 (data not shown). Furthermore, overexpression of N4BP1 specifically enhanced the transactivation ability of p73 α and c-Jun, but not of p73 γ - and p53 (SI Fig. 9 and data not shown). These data suggest that N4BP1 is a previously unrecognized regulator able to finely tune p73 and c-Jun transcriptional function.

Itch undergoes self-ubiquitylation *in vivo* (10, 11). Similarly to its substrates, Itch autoubiquitylation activity was strongly inhibited by coexpression of N4BP1 (SI Fig. 10). The catalytically inactive Itch mutant (Itch-C830A) was only slightly ubiquitylated *in vivo*, likely because of the endogenous Itch E3 activity, which was also inhibited by N4BP1 (SI Fig. 10). However, the steady-state levels and the decay rate of endogenous Itch were not affected by N4BP1 in different cell lines (SI Fig. 10 and data not shown) nor were they altered in N4BP1 knockout MEFs and on N4BP1 RNAi (Fig. 3D and data not shown). These findings suggest a nonproteolytic regulatory function for Itch self-ubiquitylation.



Our results demonstrated that N4BP1 specifically associates with the WW domain-containing central region of Itch and point out that both N4BP1 and p73 α interact with the WW2 domain of Itch. As a consequence, N4BP1 strongly inhibits Itch-catalyzed polyubiquitylation by preventing the interaction with its substrates, thereby reducing the transfer of ubiquitin molecules to Itch protein targets. Hence, N4BP1 interferes with the proteolytic pathway of both p73 α and c-Jun, leading to protein stabilization and increased transcriptional activity. Interestingly, a similar but nonoverlapping competition mechanism, which is based on the ability of the adapter protein Yes-associated protein 1 (Yap1) to recruit p73 via its WW domains, has been recently described (27). Binding of Yap1 to the PY motif of p73 prevents access to Itch and results in p73 protein stabilization. Similarly, binding of the WW domain-containing oxidoreductase

normalized to the amount of glutathione-Sepharose resin as assessed by anti-GST IB. (C) GST fusion proteins of the individual WW domains of Itch were bound to glutathione-Sepharose beads and incubated with *in vitro*-translated HA-p73 α . Protein complexes were analyzed by IB analysis using anti-p73 antibody.

(WVOX) to the same PY motif antagonizes the coactivation ability of Yap to mediate p73-mediated transcription (28).

The competition mechanism and the ability of the catalytically defective mutant, Itch C830A, to be *in vivo* ubiquitinated by endogenous Itch strongly suggest that the autoubiquitylation occurs through an *in trans* reaction. Interestingly, Itch C830A can be properly *in vitro* polyubiquitinated by the wild-type E3 (data not shown), demonstrating that Itch catalyzes the transfer of ubiquitin from its catalytic cysteine to a nearby E3 molecule. In line with our observations, Gallagher *et al.* (11) have recently demonstrated that both the Itch WW and HECT domains have the ability to interact with the full-length protein. Although the WW–HECT-mediated association is engaged in negative regulatory intramolecular interactions, a fraction of Itch may also be available for intermolecular interactions as well as for substrate binding. Alternatively, intramolecular interactions could be replaced by intermolecular interactions in response to cellular stress.

Developing therapeutic approaches for cancer treatment targeting protein degradation is currently an attractive research avenue. An effective therapeutic approach would be targeting specific components of the ubiquitin system, such as the E3 enzymes. For instance, the inhibition of the E3 activity of Itch could be used to increase chemosensitivity of tumor cells by selectively up-regulating p73, p63, and c-Jun basal protein levels. The importance of Itch down-regulation becomes evident in response to DNA damage-based chemotherapeutic drugs, in which reduction of its protein levels leads to p73 α stabilization and increased proapoptotic function (ref. 12 and our unpublished observations). The identification of N4BP1 as a specific inhibitor of Itch-mediated ubiquitylation of tumor suppressor molecules may provide an alternative means to selectively block Itch function and thereby regulate tumor progression and the response of cancer cells to chemotherapy.

It remains a challenge for future research to elucidate the relative contribution of N4BP1 on Itch-mediated regulation of protein proteasomal degradation in both physiological and pathophysiological conditions.

Materials and Methods

Cell Culture and Transfection Conditions. MEFs were derived from 13.5-day-old *N4BP1* wild-type and knockout embryos (R.M. and M.R.K., unpublished manuscript). Cells were maintained in DMEM supplemented with 100 μ g/ml penicillin and streptomycin and 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO) in 5% CO₂ at 37°C. Transfections were performed using Effectene (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

Immunoblot Analysis and IP. Cells were lysed in RIPA buffer (0.15 mM NaCl/0.05 mM Tris-HCl, pH 7.2/1% Triton X-100/1% sodium deoxycholate/0.1% SDS) (29) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche, Indianapolis, IN). Immunoblot (IB) analysis was performed under standard procedures (29). The following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-N4BP1 (8), monoclonal anti-p73 (Abcam, Cambridge, MA), anti-p53 (clone DO-1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-HA (clone H11; Covance, Richmond, CA); rabbit polyclonal anti-GFP (Clontech, Mountain View, CA); anti-Flag (clone M2; Sigma); goat polyclonal anti-GST (Promega, Madison, WI); monoclonal anti-Itch (BD Biosciences, San Jose, CA); monoclonal anti-Myc (Cell Signaling, Beverly,

MA); monoclonal anti-c-Jun (BD Biosciences), anti-JunB (clone N-17; Santa Cruz Biotechnology), monoclonal anti-V5 (Invitrogen, Carlsbad, CA). For IP, cells were lysed in Nonidet P-40 lysis buffer (29). Samples were precleared with protein A/G-Sepharose beads and then immunoprecipitated for 2 h at 4°C with 0.5–1 μ g per sample of the appropriate antibodies preadsorbed on protein A/G-Sepharose beads. Immunocomplexes were washed four times in lysis buffer and eluted by boiling in SDS loading buffer.

GST-Pulldown Assays. GST-tagged recombinant proteins were purified using glutathione beads (GE Healthcare, Piscataway, NJ). V5-tagged N4BP1 (N4BP1-V5) and HA-tagged p73 (HA-p73) were produced *in vitro* using the T7-Rabbit reticulocyte system (Promega). Binding reactions typically contained 1–10 μ g of the Sepharose-immobilized GST fusion proteins or GST and 3–15 μ l of the *in vitro* translated protein in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5/200 mM NaCl/0.1% Triton X-100). The reactions were incubated with gentle inversion for 1 h at 4°C, followed by five washes with binding buffer. Complexes were resolved by SDS/PAGE and probed with the indicated antibodies.

In Vivo Ubiquitylation Assay. *In vivo* ubiquitylation assays were performed as described in ref. 29. Briefly, cells were transiently transfected with indicated expression vectors for 24 h. Cells were treated with 40 μ M proteasome inhibitor MG-132 (Calbiochem, San Diego, CA) for 1 h before harvesting and then were lysed in denaturing RIPA buffer (0.15 mM NaCl/0.05 mM Tris-HCl, pH 7.2/1% Triton X-100/1% sodium deoxycholate/0.1% SDS). IPs were performed as described above. Polyubiquitylated species were detected using anti-HA antibody.

In Vitro Ubiquitylation Assay. The ubiquitylation reaction mixture and conditions for the assay were carried out as described in ref. 12. Briefly, the ubiquitylation reaction mixture contained 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2.5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 2 μ l of *Escherichia coli* BL21 bacterial extracts overexpressing wheat E1, 0.1 μ g of UbCH7, 1 μ g of purified recombinant Itch Δ C2, and 5 μ g of Flag-tagged ubiquitin. After incubation for 90 min at 30°C, the reactions were terminated by boiling in SDS loading buffer and resolved by SDS/PAGE, followed by IB with anti-Flag.

RNAi-Mediated Silencing of N4BP1. The predesigned Lamin A/C and N4BP1 siRNAs oligos were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO) and, Qiagen (N4BP1.3 HP) and Ambion (Austin, TX) (N4BP1-141575), respectively. Target cells were transfected with the siRNA duplexes by using Oligofectamine (Invitrogen) at a final concentration of 100 nM.

We thank Dr. Angelo Peschiaroli for helpful discussions and for critical review of the manuscript. This work was supported by European Union Grant LSHB-CT-019067; the Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base Grants RBNE01KJHT.004 and RBNE01NWCH.008; the Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca/Programma di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale Grant 004064744.003; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Grant 1338; Istituto Superiore di Sanità Grant 530/F-A19; Grant Telethon GGPO4110 (to G.M.); the Kimmel Scholar Award (to R.I.A.); and the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, National Cancer Institute, and Center for Cancer Research (M.R.K.).

- Pickart CM (2001) *Annu Rev Biochem* 70:503–533.
- Ciechanover A (2005) *Cell Death Differ* 12:1178–1190.
- Hershko A (2005) *Cell Death Differ* 12:1191–1197.
- Rose I (2005) *Cell Death Differ* 12:1198–1201.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2563–2567.
- Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D (1997) *EMBO J* 16:6325–6336.

- Harvey KF, Dinudom A, Komwatana P, Jolliffe CN, Day ML, Parasivam G, Cook DI, Kumar S (1999) *J Biol Chem* 274:12525–12530.
- Murillas R, Simms KS, Hatakeyama S, Weissman AM, Kuehn MR (2002) *J Biol Chem* 277:2897–2907.
- Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG (1998) *Nat Genet* 18:143–146.
- Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M (2004) *Science* 306:271–275.

11. Gallagher E, Gao M, Liu YC, Karin M (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1717–1722.
12. Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G (2005) *EMBO J* 24:836–848.
13. Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA, Croce C, Melino G (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12753–12758.
14. De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G (1998) *J Exp Med* 188:1763–1768.
15. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, Hugli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, *et al.* (2001) *Cell Death Differ* 8:1213–1223.
16. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, *et al.* (2003) *Cancer Cell* 3:387–402.
17. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, Lena AM, Candi E, Terrinoni A, Catani MV, *et al.* (2005) *EMBO J* 24:2458–2471.
18. Osborn MT, Chambers TC (1996) *J Biol Chem* 271:30950–30955.
19. Sudol M, Recinos CC, Abraczinskas J, Humbert J, Farooq A (2005) *IUBMB Life* 57:773–778.
20. Komuro A, Saeki M, Kato S (1999) *J Biol Chem* 274:36513–36519.
21. Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, Fang D, Hunter T, Liu YC (2000) *J Biol Chem* 275:35734–35737.
22. Kang H, Freund C, Duke-Cohan JS, Musacchio A, Wagner G, Rudd CE (2000) *EMBO J* 19:2889–2899.
23. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) *Nature* 387:296–299.
24. Musti AM, Treier M, Bohmann D (1997) *Science* 275:400–402.
25. Shcherbik N, Kumar S, Haines DS (2002) *J Cell Sci* 115:1041–1048.
26. Henry PC, Kanelis V, O'Brien MC, Kim B, Gautschi I, Forman-Kay J, Schild L, Rotin D (2003) *J Biol Chem* 278:20019–20028.
27. Levy D, Adamovich Y, Reuven N, Shaul Y (2006) *Cell Death Diff* 14:743–751.
28. Aqeilan RI, Donati V, Palamarchuk A, Trapasso F, Kaou M, Pekarsky Y, Sudol M, Croce CM (2005) *Cancer Res* 65:6764–6772.
29. Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, Melino G, Pandolfi PP (2004) *J Exp Med* 199:1545–1557.

Review

Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer

G Melino^{1,2}, E Gallagher³, RI Aqeilan⁴, R Knight², A Peschiaroli¹, M Rossi², F Scialpi¹, M Malatesta¹, L Zocchi¹, G Browne², A Ciechanover⁵ and F Bernassola^{*,1,6}

The HECT-type E3 ubiquitin ligase (E3) Itch is absent in the non-agouti-lethal 18H or *Itchy* mice, which develop a severe immunological disease, including lung and stomach inflammation and hyperplasia of lymphoid and hematopoietic cells. The involvement of Itch in multiple signaling pathways and pathological conditions is presently an area of extensive scientific interest. This review aims to bring together a growing body of work exploring Itch-regulated biological processes, and to highlight recent discoveries on the regulatory mechanisms modulating its catalytic activity and substrate recognition capability. Our contribution is also an endeavor to correlate Itch substrate specificity with the pathological defects manifested by the mutant *Itchy* mice.

Cell Death and Differentiation (2008) 15, 1103–1112; doi:10.1038/cdd.2008.60

The E3 protein ubiquitin ligase (E3) Itch, or atrophin-1 interacting protein 4 (AIP4, hereafter referred to as Itch), was originally identified through genetic studies aimed to examine the *agouti* locus, whose mutation results in coat color alterations in mice.¹ The 18H mutation, which is associated with a darker coat, arises from a radiation-induced chromosomal inversion that deletes 18 and 20 base pairs from the proximal and distal inversion breaks, respectively. The inversion disrupts the expression of *agouti* and *Itch* genes.¹

The *Itch* gene encodes 854 amino acids with a relative molecular weight of 113 kDa. Itch is a monomeric protein, which belongs to the homologous to E6-AP carboxy terminus (HECT)-type family of E3s, whose modular structural organization consists of an N-terminal Ca²⁺-dependent phospholipid-binding C2 domain, multiple protein–protein interaction WW domains, and a C-terminal HECT domain.² The latter coordinates with cognate E2 ubiquitin-conjugating enzyme (E2), and contains an evolutionary conserved cysteine, which forms thioester complexes with ubiquitin, before final attachment of ubiquitin to the target proteins.³ Itch possesses four WW domains and a unique proline-rich motif (PRR) located between residues 195 and 246, display-

ing important regulatory functions. Similarly to other HECT-type E3s, Itch WW domains most commonly recognize the Pro-rich PPXY (PY) consensus sequence, though they also interact with phospho-Ser/phospho-Thr followed by a Pro residue. In addition, atypical interactions with unrelated modular domains in the substrate^{4–6} or adaptor proteins^{7,8} have been described.

Although a small fraction of Itch displays a perinuclear distribution overlapping with the trans-Golgi network, the protein is predominantly associated with early and late endosomal compartments and lysosomes.^{5,9} Localization of Itch to the endocytic vesicles is mediated by the C2 domain.

The non-agouti-lethal 18H or *Itchy* mice display severe immune and inflammatory defects and manifest a persistent scratching of the skin.¹ On the C57BL/6J background, Itch deficiency results in spontaneous development of a late onset and progressively lethal systemic autoimmune-like disease, characterized by lymphoproliferation in the spleen, lymph nodes and medulla of the thymus, and by chronic pulmonary interstitial inflammation. Death, occurring at 6–8 months of age, is likely caused by hypoxia, associated with pulmonary inflammation and alveolar proteinosis.

¹IDI-IRCCS Biochemistry Laboratory, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome 'Tor Vergata', Via Montpellier 1, Rome 00133, Italy; ²Medical Research Council, Toxicology Unit, Hodgkin Building, Leicester University, Lancaster Road, P.O. Box 138, Leicester LE1 9HN, UK; ³Royal Free & University College Medical School, 46 Cleveland Street, London W1T 4JF, UK; ⁴Human Cancer Genetics, Ohio State University, Biomedical Research Tower, Room 1088, 460 West 12th Avenue, Columbus, OH 43210, USA and ⁵Cancer and Vascular Biology Center, The Rappaport Faculty of Medicine and Research Institute, Technion-Israel Institute of Technology, Efron Street, Bat Galim, Haifa 31096, Israel

*Corresponding author: F Bernassola, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome 'Tor Vergata', Via Montpellier 1, Rome 00133, Italy. Tel: +39 06 72596469; Fax: +39 06 20427290; E-mail: bernasso@uniroma2.it

⁶Current address: IEO c/o IFOM-IEO Campus, Via Adamello 16, 20139 Milan, Italy.

Keywords: ubiquitin E3 ligase; apoptosis; JunB; p53 family members; Notch

Abbreviations: AICD, activation-induced cell death; c-FLIP_L, cellular FLICE-inhibitory protein; EGFR, epidermal growth factor receptor; HECT, homologous to E6AP COOH-terminus; JNK, jun N-terminal kinase; ICD, intracellular domain; IL, interleukin; Mekk1, mitogen and extracellular kinase kinase 1; PLC- γ 1, phospholipase C- γ 1; PKC- θ , protein kinase θ ; PY motif, proline-rich sequence; RING, really interesting new gene; Smurf, SMAD ubiquitylation regulatory factor; *Su(dx)*, suppressor of *deltex*; TCR, T-cell receptor; TGF β R, transforming growth factor- β receptor; TNF α , tumor necrosis factor- α ; TH, T-helper lymphocyte

Received 25.2.08; revised 26.3.08; accepted 26.3.08; Edited by P Nicotera

Antigen-stimulated naïve CD4⁺ T-helper (T_H) cells can differentiate into two distinct subsets of effector cells, T_H1 and T_H2, defined by specific cytokine profiles and distinct immune regulatory functions. T_H2 cells typically produce interleukin-4 (IL-4) and counteract extracellular pathogens. Dysregulation of the T_H2-type response is typically responsible for development and maintenance of asthmatic and allergic diseases such as allergic airway inflammation and atopic dermatitis. In response to anti-CD3 and anti-CD28 costimulation, the *Itch* null T lymphocytes display increased production of T_H2 cytokines (e.g. IL-4 and IL-5), causing biased differentiation of CD4⁺ cells into T_H2 cells and chronic activation.¹⁰ As a consequence, the *Itchy* null mice exhibit a higher level of T_H2-dependent immunoglobulin (Ig) G1 and E subtypes than their normal counterpart.¹⁰

It is relevant to point out that the phenotypic characterization of the *Itchy* mice on the JU/Ct or C57BL/10 background has revealed that the bias toward production of T_H2-derived cytokines is not the only determining factor in the development of the autoimmune disease.¹¹ As recently reported by Parravicini *et al.*,¹¹ *Itch* disruption in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells causes expansion of B1b lymphocytes leading to IgM elevation, and initiates IgE production, respectively. The expansion of B1b cells and elevated Ig levels correlated with itching and other inflammatory symptoms. The availability of different animal models of *Itch* deficiency will certainly contribute to unveil the complex molecular defects underlying the autoimmune pathology.

With few exceptions, *Itch* typically regulates the stability of both transmembrane receptors through canonical monoubiquitylation or multiubiquitylation, and intracellular substrates through polyubiquitylation, driving them to lysosomal and proteasomal degradation, respectively. Proteolysis-independent ubiquitylation events have been also ascribed to the E3 activity of *Itch*.^{6,12} A growing number of new substrates and regulatory pathways along with the functional versatility of *Itch*

have been recently brought to light. By illustrating *Itch* substrate specificities, here, we review the different biological processes involving its E3 activity. The main features of *Itch* substrates are summarized in Table 1.

Itch Substrates in Relation to Their Biological Functions

Regulation of the immune response. Notably, several *Itch* substrates are central players or modulators of the immune response. By providing a portrait of *Itch* protein targets, we intend to bring together *Itch* substrate specificity with its ability to regulate the immune system, and ultimately, with the pathological defects developed by the mutant *Itchy* mice.

Jun family members: the molecular basis underlying Itch-regulated differentiation of T lymphocytes. The identification of c-Jun and JunB as two *Itch* protein substrates^{8,10,13} has shed light on the molecular basis underlying the immunological phenotype of the *Itchy* mice. JunB and c-Jun contain PY or PXY motifs that serve as binding site for *Itch* WW domains. Ubiquitin-conjugated c-Jun is mainly localized to lysosomal vesicles and its degradation appears to involve both the lysosomal and the proteasomal pathways.¹³ As a result of *Itch*-mediated canonical ubiquitylation of its substrate JunB, IL-4 promoter occupancy by this transcription factor is greatly reduced upon T-cell receptor (TCR) stimulation.¹⁰ As JunB protein selectively accumulates in T_H2 cells and is involved in T_H2 cell differentiation through the transcriptional regulation of IL-4 and IL-5 promoters,^{14,15} it represents a good candidate mediating the dysregulation of CD4⁺ T-lymphocyte function observed in the *Itchy* mice. Under physiological conditions, *Itch*-induced degradation of JunB maintains the levels of IL-4 at low concentrations, thus attenuating the T_H2 differentiation response (Figure 1). On the other hand, aberrant expression of JunB, such as a result

Table 1 Main features of *Itch* substrates

Substrate	Function	Biological outcome	Regulators/adaptors	References
c-Jun	Transcription factor	Regulation of T _H 2 cell differentiation/anergy	JNK, N4BP1	8,10,12,49,50
Jun-B	Transcription factor	Regulation of T _H 2 cell differentiation/anergy	JNK, Fyn, Ndfip1	10,12,49,50,54,60
PLC- γ 1	Phospholipase	Regulation of T-cell anergy	Unknown	16
PKC- θ	Kinase	Regulation of T-cell anergy	Unknown	16
Notch	Transcription factor	Regulation of autoimmunity	Numb	4,20
Gli	Transcription factor	Repression of Hedgehog signaling	Numb	61
Deltex	Regulator of Notch signals	Regulation of autoimmunity	Unknown	22
Smad2	Receptor-activated Smad	Activation of TGF β R signaling	Unknown	11
TIEG1	Transcription factor	Activation of TGF β R signaling	Unknown	27
P73	Transcription factor	Regulation of apoptosis, neural development, cancer	N4BP1	34,8
P63	Transcription factor	Regulation of apoptosis, epithelial development, cancer	N4BP1	35,8
c-Flip	Apoptosis inhibitory protein	Regulation of apoptosis	JNK	43
ErbB4	Growth factor receptor	Epithelial kinase receptor, cancer	Unknown	48
Endophilin A1	Protein of the endocytic machinery	Regulation of EGFR endocytosis	Unknown	9
CXCR4	Chemokine receptor	Agonist-dependent sorting of G protein-coupled receptors	Unknown	5
Hsr	Protein of the endocytic machinery	Regulation of cargo sorting	Unknown	5
TRPV4, TRPC4	Cation channels	Regulation of channel recycling and abundance at the cell surface	Unknown	6
<i>Itch</i>	E3 ubiquitin ligase	Control of protein stability, potential regulation of E3 catalytic activity	USP9X/FAM	8,49,50,55

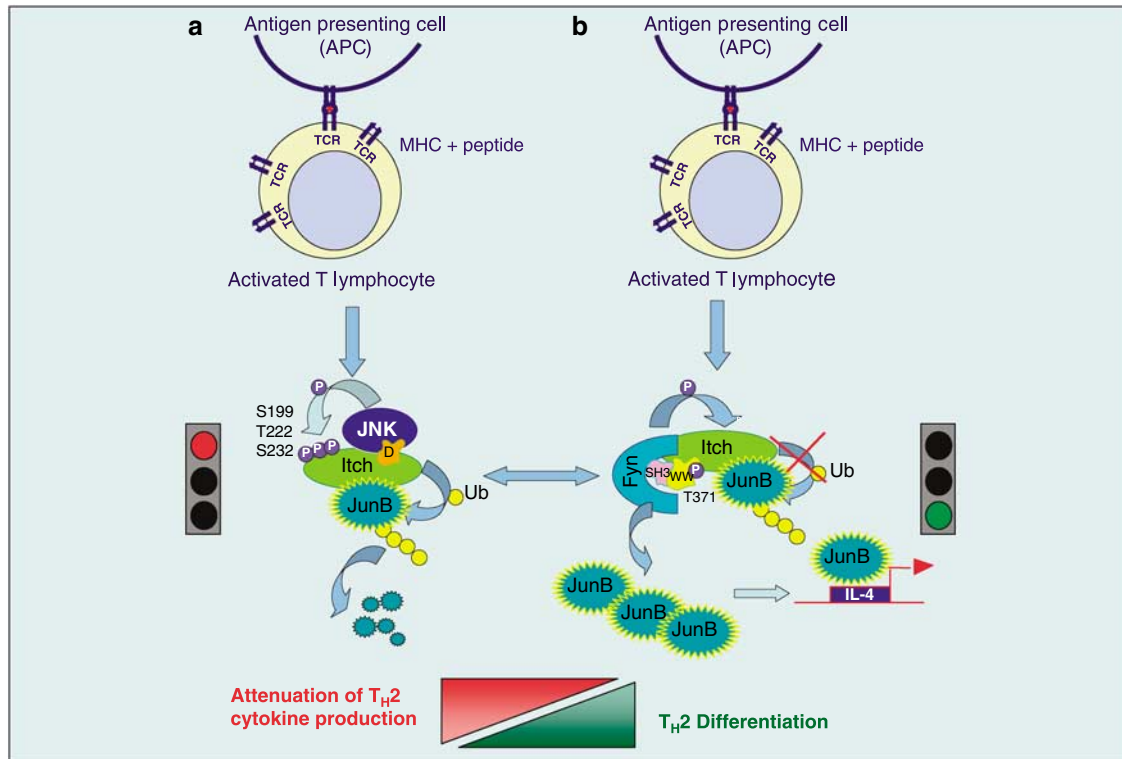


Figure 1 Itch regulation upon TCR engagement. Interaction of a TCR with its cognate antigenic peptide bound to an MHC class II molecule activates a $CD4^{+}$ T-cell response. (a) Attenuation of a T_H2 response is mediated by the JNK/MAPK signaling. T-lymphocyte stimulation initiates the JNK/MAPK signaling cascade culminating in JunB degradation through the phosphorylation-dependent activation of Itch. Serine/threonine phosphorylation of Itch attenuates the polarization of $CD4^{+}$ T-lymphocytes into T_H2 effector cells and could prevent JunB from driving IL-4 production in response to strong T-cell activating signals. (b) Potentiation of a T_H2 response is promoted by the Src kinase Fyn. An additional level of regulation of Itch activation in response to TCR stimulation is achieved through the Fyn tyrosine kinase signaling pathway. Fyn-catalyzed Tyr371 phosphorylation of Itch prevents its association with JunB. As a consequence of reduced substrate recognition, ubiquitin conjugation and proteasomal proteolysis of JunB are diminished, and augmented IL-4 production accelerates T_H2 differentiation. Thus, JunB turnover is finely controlled by upstream kinases through counterbalancing serine/threonine versus tyrosine phosphorylation of Itch

of *Itch* mutation or downregulation, polarizes T cells toward the T_H2 -differentiated features, ultimately causing T-cell hyperproliferation and abnormal allergic responses, including elevated serum IgG1 and IgE.¹⁰ The loss-of-function approach, in which JunB is selectively deleted in T-lymphocytes complements and functionally supports the observation that, enhanced JunB activity due to either *Itch* loss¹⁰ or JunB overexpression in mice,¹⁴ leads to a shift of $CD4^{+}$ T cells toward the T_H2 phenotype. JunB-deficient mice indeed exhibit an impaired allergen-induced airway inflammation.¹⁵

PLC- γ and PKC- θ : *Itch* as a T-cell anergy determinant. Induction and maintenance of peripheral immune tolerance is accomplished through the activation of clonal T-cell anergy, a process that prevents the ability of autoreactive lymphocytes to differentiate and proliferate in response to a self-antigen peptide. Anergy induction is triggered by stimulation of the TCR in the absence of the CD28 costimulatory signal on the surface of the antigen-presenting cell (APC), and is typically characterized by the inability of T cells to produce IL-2, even following the re-stimulation of the TCR and the costimulatory receptor. The establishment of the anergy state requires the Ca^{+2} /calcineurin-mediated sustained activation of the NFAT

transcription factor, in the absence of AP-1 cooperation. Maintenance of T-cell anergy is achieved through the ubiquitin-mediated degradation of key signaling molecules, which ultimately disrupt the integrity of the immunological synapse after restimulation of anergic cells. This aspect has been reviewed at length elsewhere.¹⁶ The immunological synapse, a supramolecular complex at the T cell/APC interface, mainly composed of adhesion molecules and TCR signal transduction machinery, is crucial for productive T-cell signaling and proliferation.

Itch regulates T-cell anergy maintenance by targeting the phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) and the protein kinase θ (PKC- θ), two key signaling molecules induced by calcium/calcineurin signaling, for monoubiquitylation. According to the model proposed by Heissmeyer *et al.*,¹⁷ *Itch* mRNA levels are induced during T-cell anergy in an NFAT-dependent manner. After restimulation of anergic cells, newly expressed *Itch* redistributes from the cytosol to the endosomal compartment, where it can associate with PLC- γ 1 and PKC- θ , which are adjacent to the immunological synapse. Following *Itch*-mediated monoubiquitylation, PLC- γ 1 and PKC- θ undergo endosomal sorting and trafficking into the lysosome for protein degradation. Decrease of PLC- γ 1 and PKC- θ abundance is thought to shorten the lifespan of the immunological synapse.

The inability to sustain stable APC contacts reduces the antigen response of anergic cells and induces T-cell unresponsiveness after TCR engagement. In addition, Itch may regulate anergy and autoimmunity by catalyzing the ubiquitin-dependent degradation of the Jun family members, thus contributing to AP-1 inactivation, and indeed the kinetics of CD3 *versus* CD3, and CD28 JunB expression in CD4⁺ T cells are different.

The critical role played by Itch in peripheral immune tolerance *in vivo* became evident from the observation that T cells from Itch deficient mice are resistant to anergy induction and do not show downregulation of PLC- γ 1 and PKC- θ following anergy-stimulating conditions.¹⁷ Besides the hampering effect exerted on signal transduction at the synapse, Itch may regulate anergy and autoimmunity by catalyzing the ubiquitin-dependent degradation of the Jun family members, thus contributing to AP-1 inactivation. JunB is indeed responsible for AP-1-dependent transactivation of the IL-2 promoter in T_H1 cells.

Therefore, the inability to induce anergy may be one of the molecular mechanisms underlying the autoimmune symptoms, such as splenomegaly and lymphocyte infiltration, manifested by the *Itch* deficient mice.

By using an *in vivo* mouse model of antigen-induced tolerance, Venuprasad *et al.*¹⁸ have recently proposed that Itch can also function as a crucial tolerogenic modulator of T_H2 cells. Under T_H2 conditions, tolerized *Itch* null T cells are more resistant to anergy induction. They indeed do not down-regulate the Jun family members, and thereby undergo sustained transcriptional activation of the IL-4 promoter.¹⁸ As a result, the *Itch* null mice are thought to develop the autoimmune symptoms, such as the allergic inflammatory lesions affecting the lung.

Notch receptors: highlighting the molecular basis of the *Itchy* autoimmune disease. The failure to establish peripheral tolerance due to enhanced levels of Jun family members, PLC- γ 1 and PKC- θ , only in part, accounts for the autoimmune disease observed in the *Itch* mutant mice. The discovery of Notch as a target of Itch-catalyzed ubiquitylation has provided an additional level of complexity to the regulation of the immune response by Itch⁴. Notch proteins (four in mammals) are evolutionarily conserved type I transmembrane receptors, which mainly function in specifying cell fate decision during differentiation and morphogenesis. Depending on tissue and context, Notch activation can either promote or restrict cell fate determination. During lymphoid development, Notch proteins play an essential role in the induction of T cell and B cell lineages and specification of T-cell effector fates, including T_H2 differentiation (reviewed in Osborne and Minter¹⁹ and references therein; Figure 2). In addition, Notch promotes activation and cell survival of mature peripheral T lymphocytes by upregulating the expression of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 and inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), and through the activation of AKT (Figure 2).²⁰

The ubiquitin/proteasome degradation pathway plays a critical role in regulating Notch signal transduction. Upon ligand binding, Notch proteins undergo a complex proteolytic maturation process, which culminates in the release of the intracellular domain (ICD). Cleavage of the receptor is triggered when the extracellular domain binds to a canonical ligand on a neighboring cell, or upon activation of CD4⁺ T lymphocytes. The transcriptionally active ICD translocates to the nucleus, where it functions as coactivator to modulate transcription of Notch target genes. Itch-mediated polyubiquitylation of the intracellular portion of membrane-tethered Notch1 results in the degradation of the ICD following

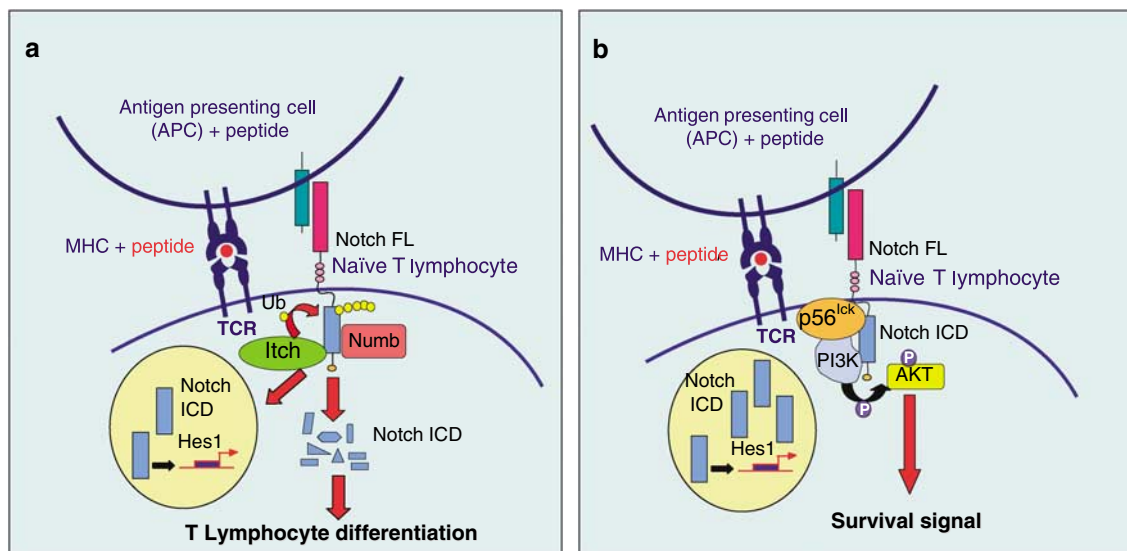


Figure 2 A model for Itch contribution to Notch-regulated lymphoid development. The Notch receptors regulate cell fate decisions during T-cell differentiation and activation. As a result of ligand binding to the extracellular domain, Notch proteins undergo a complex processing mechanism, culminating with the release of the transcriptionally competent ICD from the membrane. (a) Following receptor activation, Itch-mediated ubiquitylation of Notch results in the degradation of the ICD, thus, in turn, antagonizing Notch nuclear activity. The protein adaptor Numb contributes to modulate the endocytic ubiquitin-dependent proteolysis of Notch1 and, thus, to finely tune the specification of T-cell fates determined by Notch signaling. (b) Under physiological conditions, Notch promotes the activation and cell survival of mature peripheral T lymphocytes, by upregulating the expression of a number of antiapoptotic proteins, including AKT. Unbalanced Notch turnover, due to Itch mutation or downregulation, would increase Notch signaling and thereby amplify survival signals leading to abnormal immune responses

receptor activation (Figure 2).^{4,21} Due to the lack of PY motifs, Notch1 is atypically recruited by Itch through the N-terminal ankyrin repeat-containing region of the ICD. As discussed later in this review, the binding affinity of Itch for Notch and the resulting receptor degradation are finely tuned by the action of the vertebrate homolog of *Drosophila* Numb.²¹ An additional level of regulation of Notch activity is accomplished through Itch-mediated degradation of Deltex, which positively controls Notch signaling pathway. Modification of Deltex with lysine29-linked polyubiquitin chains labels it for the endocytic pathway, and ultimately, for lysosomal proteolysis.²²

Notch has been proposed as one of the most relevant Itch target, responsible for the autoimmune phenotype manifested by the *Itchy* mice. *In vivo* studies using an activated *Notch1* transgene specifically expressed in developing thymocytes showed that increased Notch1 signaling results in a chronic autoimmune-like disease, resembling the *Itchy* mouse symptoms.²³ Even more remarkably, the *Itchy* mutant mice expressing the activated *Notch1* transgene, display even more severe pathological lesions including splenomegaly, hepatomegaly and lymphadenopathy, chronic inflammation as well as a significant earlier disease onset. Notch signaling positively regulates the expression of IL-4 by CD4⁺ T cells. It is, therefore, likely that the hyperproliferative and inflammatory phenotype manifested by the *Itchy* mice is worsened by further production of IL-4 due to increased expression of Notch in the double-mutant mice. In addition, the mutations in concert yielded a novel phenotype including a perturbation of T-cell development (e.g. negative or positive selection). The severity of the disease correlated with increased Notch1 protein levels, leading to augmented AKT signaling pathway. The survival signal generated through phosphorylated AKT would then allow the persistence of pathological cells that can initiate the autoimmune disease.²⁴

Notch signaling and its regulation pathways are evolutionarily conserved mechanisms. The *Drosophila* mutant *Suppressor of dextex* (*Su(dx)*) was originally identified as a suppressor of the wing vein thickening caused by *dx*. Phylogenetic analysis suggests that *Su(dx)* is the *Drosophila* ortholog of mouse Itch. *Su(dx)* functions as a negative regulator of Notch signaling and interacts with Notch by direct association of its WW domain 3 (WW3) and a PY motif located on the ICD.

Proteolysis-independent roles of Itch in the positive regulation of the TGF- β signaling. The intracellular signaling downstream ligand-dependent activation of the transforming growth factor- β receptor (TGF β R) is tightly controlled by the ubiquitin machinery.²⁵ Besides the well acknowledged role of the Smad ubiquitylation regulatory factor (Smurf) E3s in attenuating the TGF- β signaling, Itch-mediated ubiquitylation of Smad2 positively modulates its phosphorylation by activated TGF β R.¹¹ Under stimulation conditions, Itch facilitates the interaction between the TGF β R and Smad2, and by this means promotes its subsequent phosphorylation in an ubiquitylation-dependent manner.

Among its multiple regulative functions in T-cell homeostasis, TGF β R signaling has a critical role in limiting T-cell-mediated autoimmunity, through the maintenance of peripheral Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T_{Reg} cells (reviewed in

Rubtsov and Rudensky²⁶ and references therein). This T_{Reg}-cell population may well play a major role in attenuating T_H2-mediated airway inflammation. Venuprasad *et al.*²⁷ have recently implicated Itch in TGF β -mediated modulation of Foxp3 expression and generation of T_{Reg} cells, through the ubiquitin-dependent transcriptional activation of the TGF β -inducible early gene 1 product (TIEG1). As Foxp3 is a transcriptional target of TIEG1, Itch ablation severely compromises TGF β -stimulated Foxp3 expression and causes resistance to TGF β -induced cell growth inhibition. These discoveries have highlighted a novel mechanism by which Itch controls allergic responses by influencing the TGF β signaling.

Cell death regulation

The p53 family members. p73 and p63 share functional similarities with the homologous transcription factor p53, being able to mediate cell cycle arrest and apoptosis in response to DNA damage-induced cellular stress.^{28–32} The tumor suppressor activity of p73 and p63 has been further corroborated by the observation that p73 heterozygous mice spontaneously develop a spectrum of histologically different tumors.³³

Under normal conditions, p73 and p63 protein levels are generally maintained low through Itch-mediated ubiquitylation.^{34,35} Both transcription factors are recruited by the WW2 of Itch⁸ through a C-terminal PY motif. The PY modules of p73 and p63 span residues 484–487 and 501–504, respectively.^{34,35} Like p53, p73 and p63 accumulate in tumor cell lines in response to γ -irradiation or treatment with various chemotherapeutic drugs.³⁶ In response to genotoxic stress, their induction and transcriptional activation is mainly controlled at the post-translational level, and, at least partially, promoted by DNA damage-caused Itch downregulation.^{34,37} The molecular mechanisms responsible for Itch downregulation following cellular stress, and whether or not aberrant expression or regulation of Itch could negatively regulate the tumor suppressive functions of the p53 family members await further investigation.

E2F1-dependent upregulation of p73 mRNA is a key determinant in the mitochondrial pathway of T-cell apoptosis initiated by the TCR signaling.^{38–41} Hence, another intriguing scenario wherein Itch may play a critical role in regulating p73 protein stability is activation-induced cell death (AICD) of T lymphocytes. Since, as discussed later in this review, Itch becomes negatively regulated in response to TCR engagement, it is conceivable that stimulation of the receptor would increase p73 protein levels and proapoptotic functions (Figure 3).

While *Itch*^{-/-} CD4⁺ T cells on the C57BL/6J background exhibit hyperproliferation following TCR stimulation *in vitro* and expansion of peripheral populations is observed, it is important to consider that the severity of the T_H2 bias is background-dependent.³⁰ In addition, CD4⁺ T cells differentiated under type 1 conditions are significantly more susceptible to AICD than T_H0 or T_H2 subsets.⁴² Consequently, our postulation of a role for Itch regulation of p73 driven CD4⁺ T-cell apoptosis *in vivo* may be a key feature of the T_H1 immune response (Figure 3). Indeed, for more complex immune responses, *Itch*^{-/-} CD4⁺ T cells undergoing T_H1 differentiation may well be preferentially deleted

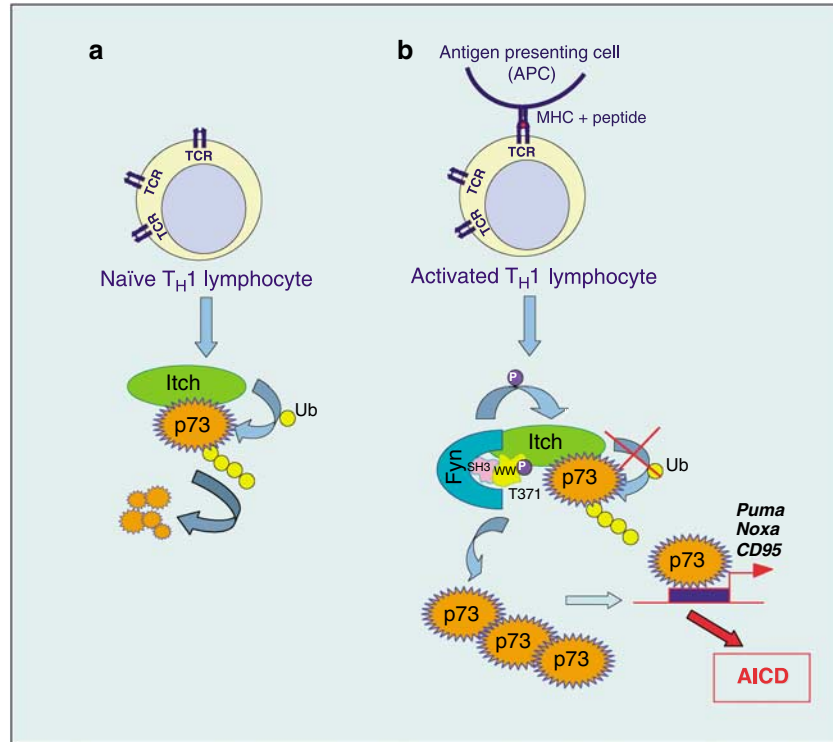


Figure 3 A model for Itch-mediated regulation of activation-induced cell death (AICD). (a) In naïve T_H1 lymphocytes, the steady state levels of p73 are kept low by the ubiquitinating activity of Itch. (b) After encounter with specific antigens, post-translational p73 upregulation in T_H1 differentiated subsets of lymphocytes could be the result of (i) Itch downregulation, (ii) transient Tyr-phosphorylation of Itch by Fyn, and (iii) the inhibitory competitive action exerted by N4BP1 on Itch substrate recruitment ability. p73 accumulation in T_H1 cells leads to increased transactivation of pro-apoptotic target genes

relative to $CD4^+ Itch^{-/-}$ cells undertaking expansion under T_H2 differentiation (Figure 1), and could well be a contributing factor to the observation of a $CD4^+$ T cell/ T_H2 expansion observed in *Itchy* mice on the C57BL/6J background.¹⁰

TNFR1 signaling: cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP_L) and receptor interacting protein 1 (RIP1). The involvement of Itch in cell death regulation becomes also evident from its ability to promote tumor necrosis factor- α (TNF α)-induced apoptosis through the proteasomal elimination of the long-splice isoform of the caspase-8 inhibitor, c-FLIP_L.⁴³ The amount of cellular c-FLIP_L crucially determines the extent of caspase-8 recruitment to the adaptor protein FADD and its rate of activation upon binding of TNF α to its type 1 receptor (TNFR1). The specificity for the c-FLIP_L variant is dictated by the selective ability of a cryptic Itch-binding domain to interact with the C-terminal caspase-8-like (CASP) domain, lacking in the shorter isoform. The *in vivo* relevance of these findings is uncovered by the observation that, the *Itchy* mutant mice exhibit protection from fulminant hepatitis, a pathological response to TNF α -receptor activation.

More recently, a role for Itch in negatively regulating inflammatory cytokine signaling by forming a functional complex with TAX1BP1 and A20 has been described. This is mediated by Itch binding to two conserved PY motifs in the zinc fingers of TAX1BP1, an activator of A20. Functionally, this novel signaling complex marks RIP1 for inactivation by proteasomal degradation. Consequently, Itch negatively regulates the amplitude of TNFR1, NF- κ B, and JNK signaling initiated by RIP1.⁴⁴

Regulation of epidermal keratinocyte differentiation.

Intriguingly, a number of Itch substrates (c-Jun, JunB, p63, Notch, Gli1) are transcription factors controlling epidermal stem cell maintenance and keratinocyte specification, as well as orchestrating the spatiotemporal progression of terminal differentiation.^{4,10,35,45} It is therefore likely that Itch-mediated degradation of some or all of these proteins would have a regulative role in skin biology.

A key regulator of the expansion of the basal keratinocyte population, as well as of the epidermal terminal differentiation is p63. According to the current model, the Δ Np63 isoform is responsible for maintaining the basal layer proliferative potential, whereas TAp63 contributes to the stratification and maturation of the suprabasal layers.⁴⁶ p63 and Itch colocalize in the adult human normal epidermis, being predominantly distributed in the basal and the upper layer, respectively.³⁵ The *in vivo* expression gradient of the substrate and the ligase is recapitulated during the *in vitro* differentiation of keratinocytes, when the accumulation of Itch is paralleled by the reduction of Δ Np63.³⁵ All together, these observations strongly indicate that Itch physiologically controls p63 steady-state protein levels, and, as such, the capacity of the transcription factor to direct the expansion of the basal compartment.³⁵

Similarly, Notch receptors have been implicated in governing the balance between proliferative basal cells and terminally differentiating suprabasal epidermal keratinocytes by committing basal progenitors to a spinous cell fate.⁴⁷ In normal epidermis, Notch1-3 receptors are primarily expressed suprabasally, where they negatively regulate the transcription of

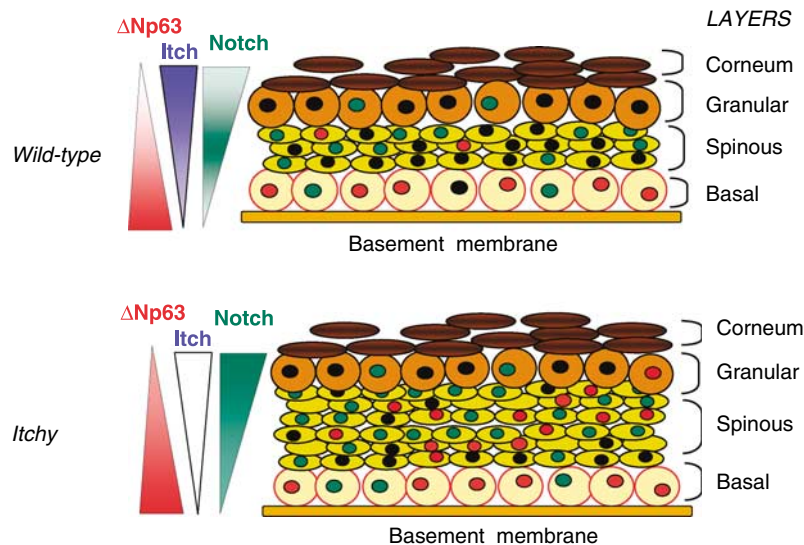


Figure 4 Itch modulates the epidermal keratinocyte differentiation program by targeting multiple substrates for protein ubiquitylation. Δ Np63 (red triangle), the predominant p63 isoform in the epidermis, is exclusively expressed in the basal proliferative compartment, Notch (green triangle) is mainly expressed in the spinous layer, while Itch (blue triangle) is present throughout the epithelium, though it mainly accumulates in the suprabasal cell layers. By regulating both Δ Np63 and Notch protein levels, Itch could exert a role in governing epidermal stratification. Itch would facilitate keratinocytes to exit the basal layer by shortening Δ Np63 half-life in the upper layers and finely tuning Notch expression to promote the basal/spinous transition (upper panel). Lack of Itch would alter the expression of its substrates and lead to epidermal hyperproliferation as a result of an increased number of cells committed to terminally differentiate (lower panel)

genes typically expressed in the basal compartment as well as they activate early genes of the keratinocyte differentiation program. Itch-mediated degradation of Notch would thus contribute to regulate spinous cell fate specification and keratinocyte differentiation (Figure 4).

Abnormal expression of p63 and Notch might be, at least partially, responsible for the increased epidermis thickness phenotype displayed by the *Itchy* mutant mice (Candi and Melino, unpublished observations, Figure 4). Blanpain *et al.*⁴⁷ have recently generated a mouse model in which the activated ICD of Notch is constitutively expressed in skin epithelium. Of note, Notch1 ICD transgenic animals display a massive expansion of the spinous layer.

Regulation of receptor trafficking and signaling. A growing body of evidence supports a role for Itch in controlling trafficking of cell signaling receptors at the endosomes. Itch is able to interfere with the endocytic transport at different levels. One such mechanism of action is to direct ligand-activated receptors to the lysosomal degradation pathway.

A recent work by Sundvall *et al.*⁴⁸ have highlighted a role for Itch in regulating endocytosis and protein stability of ErbB-4, a receptor belonging to the epidermal growth factor receptor (EGFR)/ErbB family. Unique to the ErbB family, following ligand binding, ErbB-4 is proteolytically cleaved to produce a tyrosine kinase IC fragment, which translocates to the nucleus to regulate transcription. In addition to targeting the ICD of ErbB-4 for lysosome-mediated degradation, Itch may interfere with the ErbB-4 signaling by competing with the WW domain-containing transcriptional coactivator Yes-associated protein (YAP) for binding. Cytoplasmic sequestration of ErbB-4 by Itch would limit the formation of the transcriptionally active ErbB-4/YAP complexes.

Though a direct effect of Itch on the protein turnover of the EGF tyrosine kinase receptor is still a matter of debate, Itch is thought to promote EGFR trafficking and contribute to EGFR signaling downregulation. Itch utilizes its WW domains to recruit the RING finger E3 Cbl, primarily responsible for the degradation of ligand-stimulated EGFR, and, as a result of this cooperative interaction, Itch would control the EGFR kinase activity.⁷

A further evidence supporting a role for Itch in controlling the EGFR signaling pathway is revealed by the discovery that endophilin-A1, a protein involved in clathrin-mediated endocytosis of the EGFR, is a substrate for endosome-localized Itch.⁹ Lacking the canonical PY recognition motif, endophilin-A1 is an additional atypical Itch protein interactor. The unusual nature of this association is achieved through the SH3 domain of endophilin-A1 and a consensus-binding motif (PXRPPXPR) within the PRR region of Itch. Upon EGFR stimulation, endophilin-A1 and the receptor translocate to the endosomal compartment. In addition, EGFR activation stimulates Itch-mediated endophilin-A1 ubiquitylation, though the precise functional role of this modification in protein trafficking regulation awaits further investigation.

In view of the interference of Itch with the EGFR signaling pathway, it is attractive to speculate that the hyperproliferation of epidermis and stomach epithelium manifested by the *Itchy* mice¹ (Candi and Melino, unpublished observations) could also be the result of increased EGFR signaling.

Itch has been also implicated in the agonist-dependent ubiquitylation of the chemokine receptor CXCR4 at the plasma membrane. Ubiquitylated CXCR4 is then targeted for lysosomal degradation. In addition, Itch regulates endosomal sorting of activated CXCR4. Upon receptor internalization, ubiquitylated CXCR4, and Itch traffic to endosomes. In this compartment, Itch mediates the ubiquitylation of Hsr, a protein of the endosomal sorting machinery, which controls ubiquitin-dependent trafficking

of cargo, including CXCR4, to the degradative pathway.⁵ It has been speculated that conjugation of ubiquitin to Hsr would affect its ability to sort cargo. Hence, Itch-mediated ubiquitylation events would, in turn, promote CXCR4 targeting for lysosomal destruction.

A different mechanism of regulation of the endosomal trafficking by Itch is accomplished by controlling endocytosis and hence the abundance of ion channels at the plasma membrane. Itch-mediated multiubiquitylation of members of the transient receptor potential (TRP) family of cation channels serves as an internalization signal, resulting in downregulation of their cell surface expression and basal activity.⁶ However, once TRP channels undergo ubiquitin conjugation, endocytosed proteins are not degraded, but rather they recycle back to the plasma membrane.

Regulatory Mechanisms Governing Itch Catalytic Activity and Substrate Specificity

Itch catalytic activity and substrate recognition properties are subjected to many levels of regulation, including several post-translational modifications and interaction with adaptor proteins.

Phosphorylation. Phosphorylation of protein substrates, which facilitates their recognition by the E3s, represents a common regulatory pathway of the ubiquitin conjugation process. Unlike the RING finger-containing E3s, the HECT type ligases typically recognize protein substrates independently of their phosphorylation state. Phosphorylation of the E3 enzymes themselves has been recently emerged as a critical post-translational modification modulating their enzymatic activity or substrate recognition properties. Biochemical and genetic studies have shown that a crucial regulatory mechanism of Itch catalytic activation is Jun N-terminal Kinase1 (JNK1)-mediated Ser/Thr phosphorylation of the E3 upon TCR engagement.⁴⁹ The JNK1 phosphoacceptor sites of Itch have been mapped within the PRR region, where three pro-directed Ser/Thr residues are located.⁵⁰ In response to T-cell activation, JNK1 docking to the D domain, located in the proximal region of the HECT domain (residues 595–604), allows multiple phosphorylation of the E3 on residues Ser199, Thr222, and Ser232. In its unphosphorylated state, Itch enzymatic activity is negatively regulated through intramolecular interactions between the central region, including the WW and PRR motifs, and the C-terminal HECT domain. Following phosphorylation, Itch undergoes a conformational change, which destabilizes the self-inhibitory intramolecular interactions, present within the ligase, thus allowing substrate recruitment and catalytic activation.⁵⁰

Key to the catalytic activity of HECT E3 ligases is the conformational flexibility conferred by a hinge-like region within the bi-lobed HECT structure.⁵¹ This flexible hinge region is critical for juxtaposing the catalytic cysteine residues of the E2 and the HECT domain, during ubiquitin transfer. Most likely the Itch auto-inhibitory conformation, whereby the PRR and HECT directly interact, prevents such flexibility within the HECT domain, greatly reducing its catalytic activity.

The activation of the JNK1 signaling pathway decreases protein turnover of the Jun family members, thus attenuating

the polarization of CD4⁺ T lymphocytes into T_H2 effector cells (Figure 1). JNK1 can also signal c-FLIP_L protein ubiquitylation via a similar phosphorylation-dependent activation of Itch.⁴³

These biochemical findings are genetically supported by the phenotypic similarities in CD4⁺ T cells between JNK1 null, mitogen and extracellular kinase kinase 1 kinase-deficient (Mekk1)^{ΔKD} and *Itchy* mice.^{10,49,52} The Mekk1^{ΔKD} mice express an inactive form of MEKK1, an *in vivo* upstream activator of JNK, ERK and p38 MAPK signaling.⁵³ Hampering Itch-mediated degradation of Jun family members, achieved either through Itch mutational inactivation or as a result of JNK1 chemical or peptide inhibition, enhances the expression of T_H2 cytokine genes (IL-4, 5, 10 and 13) in CD4⁺ T cells challenged with T_H2 polarization conditions.⁴⁹ Hence, the MEKK1-JNK signaling pathway plays a crucial role in the negative regulation of T_H2 differentiation as well as of peripheral immune tolerance induction.^{18,49}

In contrast to the positive regulation induced by the JNK1 pathway, the Src kinase, Fyn, phosphorylates Itch on Tyr 371 residue, leading to the inhibition of its E3 activity.⁵⁴ Transient Tyr phosphorylation of Itch occurs in T lymphocytes in response to TCR engagement (Figure 1). Fyn binding to Itch is mediated through the interaction of Fyn SH3 domain with WW3 of Itch. Similarly, Tyr371 is located at the N-terminus of Itch WW3 domain. Following Tyr371 phosphorylation, the association between Itch and its substrates, such as JunB is hampered. Hence, after TCR stimulation, Itch-mediated ubiquitin conjugation to JunB is reduced and the transcriptional factor stabilized. Due to augmented JunB degradation, Fyn-deficient T lymphocytes display a decreased production of T_H2 cytokines. An additional level of regulation of Fyn activation in response to TCR stimulation could be achieved through the stabilization of p73. In activated T_H1 cells, the negative control exerted on Itch may result in increased protein turnover rate and induction of AICD (Figure 3).

The MEKK1-JNK1 and Fyn signaling pathways oppositely regulate the turnover of Jun family members and the immune response by counteracting Ser/Thr and Tyr phosphorylation. These dynamic phosphorylation events, in turn, would result in the attenuation and potentiation of T_H2 differentiation, respectively (Figure 1).

Ubiquitylation against deubiquitylation. Itch undergoes auto-ubiquitylation *in vivo*.^{8,49,50,55} The molecular nature and the physiological relevance of Itch self-modifications have just begun to be elucidated. It has been recently proposed that, similarly to other E3s, Itch autocatalytic activity negatively controls its protein stability.⁵⁵ Nevertheless, Itch auto-ubiquitylation can also provide a non-proteolytic regulatory function, such as modulating its cellular localization or catalytic activity^{49,50} (Scialpi, Melino, Bernassola, personal communication). Ubiquitin self-conjugation of Itch is subjected to different levels of control, being stimulated by JNK activation⁵⁰ or inhibited by the association with the protein interactor, Nedd4-binding partner-1 (N4BP1),⁸ illustrated later in this review.

Furthermore, Itch is a substrate for the deubiquitylating activity of FAM/USP9X, a member of the ubiquitin-specific proteases (USPs).⁵⁵ By counteracting Itch self-ubiquitylation, FAM/USP9X protects the ligase from proteasomal

degradation. It could be also possible that FAM/USP9X serves to generate mono-ubiquitylated species, thus adding an additional level of control on the E3.

Interaction with adaptor proteins. The HECT E3s can cooperate with accessory and adaptor proteins, which contribute to modulate their substrate recruiting capacity, subcellular localization, and enzymatic activity (reviewed in Shearwin-Whyatt⁵⁶ and references therein). Itch-interacting proteins enable further specificity to the ubiquitylation reaction. Furthermore, the existence of noncanonical substrates^{4–6} suggests that Itch could be recruited to some of its protein targets through an adaptor molecule.

N4BP1 is a novel Itch negative regulator, acting as a competitor of its substrate recruitment ability.⁸ Although N4BP1 does not contain canonical WW domain docking sites, its binding to these modules determines displacement of the substrates from the ligase. Itch-mediated transfer of ubiquitin to its protein targets is then prevented, and the half-life of the substrates prolonged. As a result, N4BP1 potentiates the transcriptional activity of both p73 and c-Jun. The competition mechanism implies that the selectivity of Itch for the substrates could be modulated either by changes in the affinity of binding to the adaptor molecule, or by alterations of their cellular availability. In this scenario, TCR stimulation-induced accumulation of c-Jun and p73 could be achieved either through N4BP1 induction, or through chemical/conformational modifications, which would enhance the affinity of N4BP1 for the E3.

Nedd4 family interacting protein-1 (Ndfip1) is a membrane-associated protein, originally discovered in an interaction screening using the WW domains of mouse Nedd4.⁵⁷ Ndfip1 possesses two N-terminal PY motifs, which mediate direct interaction with Nedd4 as well as Itch.⁵⁸ In yeast, the Ndfip1 ortholog Bsd2 functions as an adaptor, recruiting the HECT domain E3 Rsp5 to substrates, thus enhancing the recognition and removal of misfolded membrane proteins.⁵⁹ In mammals, the biological outcome of such interaction is promoting itch-mediated degradation of target substrates.⁶⁰ This physical association becomes particularly relevant after T-cell stimulation, when, as a result of Ndfip1 induction, Itch is relocalized from the intracellular vesicles to the inner surface of the plasma membrane. Consequently, enhancement of JunB degradation prevents T_H2 cytokine production. This functional interaction is corroborated by the phenotype manifested by the *Ndfip1* knockout mice. Similarly to the *Itchy* mice, *Ndfip1* deficient animals are prone to develop a severe skin and lung inflammation, accompanied by hepatomegaly and splenomegaly, and high numbers of infiltrating eosinophils at the inflammatory sites. Lack of *Ndfip1* predisposes T lymphocytes toward a T_H2 phenotype, and biases them toward the production of T_H2 cytokines.

Another Itch protein interactor exhibiting a regulatory role is the vertebrate homolog of *Drosophila* Numb.²¹ The mammalian Numb protein, whose phosphotyrosine-binding (PTB) domain recruits the C-terminal ICD of Notch, cooperatively enhances Itch-catalyzed ubiquitylation of the membrane-bound receptor, and specifically promotes the ICD degradation following receptor activation (Figure 2). This effect is achieved through direct binding of Numb to Itch WW1/2 domains. By promoting rapid degradation of Notch1 ICD,

Numb prevents the translocation of the activated receptor to the nucleus and, ultimately, inhibits Notch-dependent signal transduction.

An additional Itch substrate whose modification by ubiquitin requires the accessory role of Numb is the transcription factor Gli, which mediates the effect of Hedgehog signaling in neural stem cell maintenance and self-renewal.⁶¹ Numb stabilizes the ligase:substrate complex, and functionally synergizes with the ligase in targeting Gli for ubiquitin-dependent proteasomal proteolysis. Since accumulation of Gli in the nucleus is the major mechanism regulating its transcriptional activation, its loss from the nuclear compartment suppresses the expression of Hedgehog target genes. As such, Numb acts as an antagonistic regulator of Hedgehog signaling during cerebellar development.

The C-terminal WW domains (2–4) of the HECT type E3s are known to directly mediate the association with the substrate providing high affinity binding to the PY motifs.^{8,62,63} A regulatory function has been instead ascribed to the first WW domain. As an example, WW1 of Nedd4 interacts with cofactors that regulate ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis of bound substrates. In principle, by interacting with regulatory WW domains of Itch, Numb might act as an adaptor facilitating or stabilizing the interaction between Itch and its substrates.

Conclusion

The ubiquitin ligase Itch plays key roles in different cellular contexts, in virtue of its functionally distinct substrates. Nevertheless, Itch targets can be simplistically categorized in two main classes: transcription factors and growth factor receptors, some of them acting as gene expression regulators as well. Aberrant accumulation of several signaling proteins such as the Jun family members and Notch due to the loss of Itch protein, critically contributes to the autoimmune phenotype of the *Itchy* mice. A significant number of the transcriptional regulators targeted by Itch for proteasomal destruction are crucially involved in controlling cell growth, differentiation, and apoptotic processes. This raises the intriguing possibility that their inappropriate removal, due to altered Itch regulation, signaling or activity, would be tightly linked to malignant transformation and chemoresistance.

Acknowledgements. We sincerely apologize for not being able to cite some relevant references because of space constraints. This work has been supported by EU-Grant EPISTEM LSHB-CT-019067; the AIRC Grant 1338; the ISS Grant no. 530/F-A19, Grant Telethon GGPO4110, and Philip Morris grant awarded to GM, and by the EU NeOEs Rubicon and NeuroNE, the Israel Science Foundation, the German Israeli Foundation, the Israel Cancer Research Fund, and the Dr. Miriam and Sheldon Adelson Medical Research Foundation awarded to AC.

1. 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 18H mice. *Nat Genet* 1998; **18**: 143–146.
2. 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.
3. 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 USA* 1995; **92**: 5249.

4. Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang H-Y, Elly C, Altman Y *et al*. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hec-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 35734–35737.
5. 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.
6. 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.
7. Courbard JR, Fiore F, Adélaïde J, Borg JP, Birnbaum D, Ollendorff V. Interaction between two ubiquitin-protein isopeptide ligases of different classes, CBL and AIP4/ITCH. *J Biol Chem* 2002; **277**: 45267–45275.
8. Oberst A, Malatesta M, Aqeilan RI, Rossi M, Salomoni P, Murillas R *et al*. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 11280–11285.
9. 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.
10. Fang D, Elly C, Gao B, Fang N, Altman Y, Joazeiro C *et al*. Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for Itch in Th2 differentiation. *Nat Immunol* 2002; **3**: 281–287.
11. Parravicini V, Field AC, Tomlinson PD, Basson MA, Zamoyska R. Itch—/— {alpha}{beta} and {gamma}{delta} T cells independently contribute to autoimmunity in Itchy mice. *Blood* 2008; e-pub ahead of print.
12. 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.
13. Fang D, Kerppola TK. Ubiquitin-mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 4782–4787.
14. Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J* 1999; **18**: 420–432.
15. Hartenstein B, Teurich S, Hess J, Schenkel J, Schorpp-Kistner M, Angel P. Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *EMBO J* 2002; **21**: 6321–6329.
16. Mueller DL. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* 2004; **5**: 883–890.
17. Heissmeyer V, Macián F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K *et al*. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol* 2004; **5**: 255–265.
18. Venuprasad K, Elly C, Gao M, Salek-Ardakani S, Harada Y, Luo JL *et al*. Convergence of Itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1117–1126.
19. Osborne BA, Minter LM. Notch signaling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 64–75.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685–700.
26. Rubtsov YP, Rudenski AI. TGF signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 443–453.
27. Venuprasad K, Huang H, Harada Y, Elly C, Subramaniam M, Spelsberg T *et al*. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol* 2008; **9**: 245–253.
28. Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 605–615.
29. Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, Knight RA. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 663–670.
30. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin Jr WG. Chemoresensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 2003; **3**: 403–410.
31. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiani G *et al*. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003; **3**: 387–402.
32. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H *et al*. TAp63 alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J* 2005; **24**: 2458–2471.
33. Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D *et al*. 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.
34. Rossi M, De Laurenzi V, Munariz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH *et al*. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J* 2005; **24**: 836–848.
35. Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA *et al*. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 12753–12758.
36. Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F *et al*. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 2002; **416**: 560–564.
37. Hansen TM, Rossi M, Roperch JP, Ansell K, Simpson K, Taylor D *et al*. Itch inhibition regulates chemosensitivity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **361**: 33–36.
38. 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.
39. Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W *et al*. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000; **407**: 645–648.
40. De Laurenzi VD, Catani MV, Terrinoni A, Corazzari M, Melino G, Costanzo A *et al*. Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 389–390.
41. Wan YY, DeGregori J. The survival of antigen-stimulated T cells requires NFkappaB-mediated inhibition of p73 expression. *Immunity* 2003; **18**: 331–342.
42. Varadhachary AS, Perdow SN, Hu C, Ramanarayanan M, Salgame P. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5778–5783.
43. Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K *et al*. 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.
44. Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE *et al*. The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol* 2008; **9**: 254–262.
45. 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.
46. Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A *et al*. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1037–1047.
47. Blanpain C, Lowry WE, Pasoli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev* 2006; **20**: 3022–3035.
48. Sundvall M, Korhonen A, Paatero I, Gaudio E, Melino G, Croce CM *et al*. Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 4162–4167.
49. Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC *et al*. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 2004; **306**: 271–275.
50. 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 USA* 2006; **103**: 1717–1722.
51. Verdecia MA, Joazeiro CA, Wells NJ, Ferrer JL, Bowman ME, Hunter T *et al*. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell* 2003; **11**: 249–259.
52. Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998; **282**: 2092–2095.
53. Gallagher E, Enzler T, Matsuzawa A, Anzelon-Mills A, Otero D, Holzer R *et al*. Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol* 2007; **8**: 57–63.
54. Yang C, Zhou W, Jeon M-S, Demydenko D, Harada Y, Zhou H *et al*. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase Itch by Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol Cell* 2006; **21**: 135–141.
55. Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A. The ubiquitin ligase Itch is auto-ubiquitinated *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.
56. 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.
57. Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, Kumar S. Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J* 2000; **351**: 557–565.
58. 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**: 9307–93017.
59. Hettema EH, Valdez-Taubas J, Pelham HR. binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J* 2004; **23**: 1279–1288.
60. Oliver PM, Cao X, Worthen GS, Shi P, Briones N, MacLeod M *et al*. 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.
61. Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA *et al*. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1415–1423.
62. Shcherbik N, Kumar S, Haines DS. Substrate proteolysis is inhibited by dominant-negative Nedd4 and Rsp5 mutants harboring alterations in WW domain 1. *J Cell Sci* 2002; **115**: 1041–1048.
63. Henry PC, Kanelis V, O'Brien MC, Kim B, Gautschi I, Forman-Kay J *et al*. Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 2003; **278**: 20019–20028.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages

Flavia Scialpi^a, Martina Malatesta^a, Angelo Peschiaroli^a, Mario Rossi^b, Gerry Melino^{a,b,*},
Francesca Bernassola^{a,c,**}

^a IDI-IRCCS Biochemistry Laboratory, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome “Tor Vergata”, Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy

^b Medical Research Council, Toxicology Unit, Hodgkin Building, Leicester University, Lancaster Road, P.O. Box 138, Leicester LE1 9HN, UK

^c IEO c/o IFOM-IEO Campus, Via Adamello 16, 20139 Milan, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2008

Accepted 22 July 2008

Keywords:

E3 ubiquitin ligases

HECT domain

Protein ubiquitylation

ABSTRACT

Itch, an E3 protein ubiquitin ligase (E3), which belongs to the homologous to E6-AP carboxy terminus (HECT)-type subfamily, catalyzes its own ubiquitylation. The precise nature of Itch-mediated self-modification and its biological outcome are not completely understood. Here, we show that Itch auto-ubiquitylation is an intermolecular reaction generating Lys63-linkages, rather than the Lys48-linked polyubiquitin chains that target proteins for proteasomal degradation. As a result, Itch is a relatively high stable protein, whose levels are not significantly affected by treatment by either proteasome or lysosome inhibitors. Furthermore, we demonstrate that the decay rate of a catalytic inactive Itch mutant, which is devoided of self-ubiquitylating activity, is barely indistinguishable from the one of the wild-type protein. These data definitely establish a nondegradative role for Lys63-linked Itch self-ubiquitylation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Itch is an E3 ubiquitin ligase (E3) belonging to the homologous to E6-AP carboxy terminus (HECT)-type E3 subfamily. Similarly to the other members of this family, Itch is composed of three distinct domains: an N-terminal C2 domain, followed by four protein-interacting WW domains, and a C-terminal catalytic HECT domain. The C2 domain, which is about 116 amino acid residues, is thought to play a role in membrane targeting and

subcellular localization. The WW module is a short domain of approximately 40 amino acids that mediates the interaction with substrates, generally containing Pro-rich, PPXY, or phospho-Ser/Thr motifs. The HECT domain is a large module, which recruits the E2 conjugating enzyme (E2) and provides the intrinsic enzymatic E3 activity [1]. Upon recruitment of the E2, the catalytic Cys residing at the C-terminus of HECT domain accepts ubiquitin from the E2, through the formation of a ubiquitin-thioester intermediate. Consequently, the

* Corresponding author at: IDI-IRCCS Biochemistry Laboratory, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome “Tor Vergata”, Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy. Tel.: +39 06 72596976; fax: +39 06 20427290.

** Corresponding author at: IDI-IRCCS Biochemistry Laboratory, Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome “Tor Vergata”, Via Montpellier 1, 00133 Rome, Italy. Tel.: +39 06 72596469; fax: +39 06 20427290.

E-mail addresses: gerry.melino@uniroma2.it (G. Melino), bernasso@uniroma2.it (F. Bernassola).

Abbreviations: c-FLIP_L, cellular FLICE-inhibitory protein; CHX, cycloheximide; E1, E1 ubiquitin activating enzyme; E2, E2 conjugating enzyme; E3, E3 protein ubiquitin ligase; HECT, homologous to E6-AP carboxy terminus; MS, mass spectrometry; Met-Ub, methylated ubiquitin; MEFs, mouse embryonic fibroblasts.

0006-2952/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2008.07.028

ubiquitin molecule is conjugated to Lys residues of the target protein, through the formation of isopeptide linkages involving the C-terminal Gly carboxyl group of ubiquitin [2–5].

Through ubiquitin-dependent proteolysis of target proteins, Itch controls distinct biological processes, including T cell differentiation, immune responses, cell death and skin morphogenesis (reviewed in [6,7]). In particular, Itch E3 activity is implicated in the regulation of the apoptotic pathway through its ability of promoting the ubiquitylation and the subsequent proteasome-dependent degradation of the p53 family member, p73 [8], and the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP_L) [9]. Itch ubiquitin ligase activity is not only implicated in catalyzing the elongation of poly-ubiquitin chains, but it also regulates the stability of transmembrane receptors through canonical mono- or multi-ubiquitylation [10,11]. Proteolysis-independent ubiquitylation events have also been ascribed to the E3 activity of Itch [12–14].

In addition to catalyzing conjugation of ubiquitin to specific substrates [8,9,15,16], and similarly to other HECT E3s [17,18], Itch promotes its own ubiquitylation [16,19–21]. Although Itch auto-ubiquitylation has been demonstrated in cells [16], the molecular nature and the physiological relevance of Itch self-modifications have just begun to be elucidated. It has been recently proposed that, similarly to other E3s, Itch auto-catalytic activity may negatively control its protein stability [20]. Itch auto-ubiquitylation is inhibited by the ubiquitin specific protease USP9X, which appears to influence Itch protein levels by counteracting self-ubiquitin conjugation [20].

The auto-ubiquitylating activity is thought to mainly act as a regulatory mechanism that controls the abundance of E3s by marking them for degradation [22,23]. However, nonproteolytic functions have recently been ascribed to E3 self-ubiquitylation [18,24]. The fate of ubiquitylated proteins is determined by the nature of ubiquitin attachment (e.g. mono- vs. poly-ubiquitylation) and by the type of isopeptide linkage forming the polyubiquitin chain. All seven internal residues of ubiquitin can potentially act as chain-elongation sites [25]. Lys48-linked poly ubiquitin chains label proteins for 26S proteasome-mediated proteolysis, while ubiquitin chains formed through Lys63, or other linkages, typically act as nondegradative signals [17,26–31]. In this study, we analyze the molecular mechanisms of Itch self-ubiquitylation and investigate its possible involvement in the regulation of Itch protein stability.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

The following reagents were used: cycloheximide (CHX, Sigma, St. Louis, MO, USA), monensin (Sigma), NH₄Cl (Sigma), chloroquine (Sigma), MG132 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES, Sigma), Adenosine 5'-triphosphate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), ubiquitin aldehyde (Sigma). The E1 ubiquitin activating enzyme (E1), the E2 UbcH7, and recombinant purified wild-type (WT) and mutant

ubiquitins were from Boston Biochem (Cambridge, MA, USA). The ubiquitin mutants were either molecules in which all Lys residues were changed to Arg (K0-Ub), or in which all Lys residues but one were replaced by Arg (K63-Ub), or in which individual Lys residues were mutated to Arg (K48R-Ub, K63R-Ub).

The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-Itch (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA), mouse monoclonal anti-Myc (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA), mouse monoclonal anti-p21 (Sigma), mouse monoclonal anti-actin (Sigma), rabbit polyclonal anti-Flag (Sigma), and mouse monoclonal anti-ubiquitin (Zymed, San Francisco, CA, USA).

For Itch expression in bacterial cells, we employed a modified construct (GST-C2-Itch) lacking the N-terminal region to avoid solubility problems due to the presence of the C2 domain. C2-Itch retains direct substrate interaction abilities as well as a functional catalytic domain. On the contrary, all plasmids utilized for the expression of wild-type and C830A-Itch in eukaryotic cells encode the full-length proteins [8].

2.2. Cell culture and transfection conditions

Human embryonic kidney HEK293T (ATTC, Manassas, VA, USA) and *Itch*^{−/−} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 100 g/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin and 10% FBS (Gibco). Transfections of HEK293T cells and MEFs were performed using the calcium phosphate method, and the Effectene reagent (Qiagen, Santa Clara, CA, USA), respectively.

2.3. Measurement of Itch half-life

Itch turnover rate was determined using CHX inhibition of protein synthesis. *Itch*^{−/−} MEFs were transiently transfected with either wild-type or C830A mutant Itch. Twenty-four hours after transfection CHX was added to the culture media to a final concentration of 80 g/ml. Cells were harvested at indicated time points, and equal amounts of cell lysates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblot (IB). The same protocol was used to analyze the half-life of endogenous Itch in HEK293T cells.

2.4. IB analysis and immunoprecipitation

To prepare whole cell extracts for IB analysis, cells were lysed in Triton lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA 1 pH 8, 0.1% Triton), supplemented with proteases and phosphatase inhibitors. Proteins were separated by SDS/PAGE and blotted onto PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with PBS-T (Phosphate-buffered saline and 0.1% Tween-20)/5% nonfat dry milk for 1 h, and then incubated with primary antibodies for 2 h at RT. After washing, membranes were incubated for 1 h at RT by using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (PerkinElmer, Waltham, MS, USA). Detection was performed with the ECL Western Blot Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer). For

immunoprecipitation, cells lysates were precleared with protein A/G-Sepharose beads (GE Healthcare, UK) for 3 h, and then immunoprecipitated with 1 g per sample of the appropriate antibodies, previously adsorbed on protein A/G-Sepharose beads (Roche Molecular Biochemicals). Immuno-complexes were washed six times in Triton lysis buffer and then used for *in vitro* ubiquitylation assay or eluted by boiling in SDS loading buffer.

2.5. *In vitro* ubiquitylation assays

The *in vitro* self-ubiquitylation assay was carried out as previously described [8]. Briefly, the ubiquitylation reaction mixture contained 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2.5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 2 l of bacterial purified wheat E1, 0.1 g of a human UbcH7, 100 ng of bacterially purified recombinant wild-type or C830A mutant GST-C2-Itch, and 5 g of Flag-tagged ubiquitin. After incubation for 90 min at 30 °C, the reactions were terminated by adding SDS loading buffer, resolved by SDS-PAGE, followed by IB with anti-ubiquitin or anti-Itch antibodies.

Alternatively, the *in vitro* ubiquitylation reaction was performed utilizing Flag-Itch immunopurified from HEK293T cells after transient transfection. Briefly, Itch immunocomplexes were washed twice with equilibration buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Triton and 10% glycerol). For each sample, 30 ng of E1, 0.5 mg of UbcH7 and 5 g of ubiquitin were added to the ubiquitylation reaction mixture (2.5 mM Tris-HCl, 0.7 mM DTT, 4 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM ubiquitin aldehyde). After incubation at 30 °C for the indicated time points, self-ubiquitylated Itch was eluted from the beads by boiling in SDS loading buffer, resolved by SDS/PAGE, followed by IB anti-Itch.

3. Results

3.1. Itch self-polyubiquitylation occurs through an intermolecular mechanism

Consistent with previous reports [8,16,19,20], Itch acts in concert with the E2 UbcH7 to promote its own ubiquitylation in a cell-free system (Fig. 1A, lanes 2–4). To further explore the molecular mechanism of Itch auto-modification, we utilized a mutant Itch in which the highly critical Cys residue in its HECT domain was mutated to Ala (Itch-C830A) [8]. The C830A mutation abrogates Itch ligase activity, and consequently, its auto-ubiquitylating capacity [21]. To assess whether Itch-mediated auto-ubiquitylation occurs through an *in cis* or *in trans* reaction, we tested the ability of Itch-C830A to serve as a substrate for the wild-type enzyme in an *in vitro* ubiquitylation assay. Interestingly, mutated Itch was properly poly-ubiquitylated by the wild-type E3, demonstrating that Itch can catalyze the transfer of ubiquitin from its catalytic Cys to a second Itch molecule which serves as a substrate (Fig. 1A, lane 2). These results are in line with our previous observation that the catalytic inactive mutant is, at least moderately, ubiquitylated *in vivo*, likely due to the activity of endogenous Itch [21].

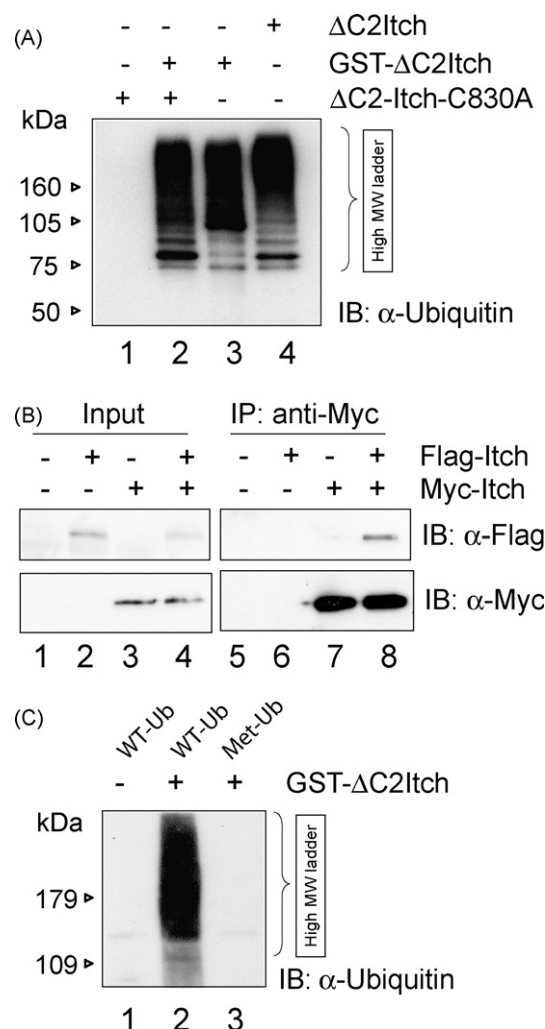


Fig. 1 – Itch self-ubiquitylation acts through an *in trans* mechanism. (A) The Itch-C830A catalytic inactive Itch mutant serves as a substrate for the ubiquitylation activity of wild-type Itch. The *in vitro* ubiquitylation reaction was performed using bacterially purified ΔC2-Itch-C830A (about 70 kDa) as a substrate for wild-type GST-ΔC2-Itch (about 100 kDa). The polyubiquitylation ladders of ΔC2Itch-C830 and GST-ΔC2Itch start at approximately 75 and 105 kDa, respectively, indicating that the self-ubiquitylation reaction involves two separate Itch molecules. (B) HEK293T cells were co-transfected using the calcium-phosphate method with flag-tagged- and myc-tagged-Itch. Forty-eight hour after transfection, cell lysates were immunoprecipitated with monoclonal anti-myc antibody and IB analysis was performed by using either anti-flag or anti-myc antibodies. Inputs and immunoprecipitates are shown on the left and right panel, respectively. (C) Bacterially purified GST-ΔC2Itch was subjected to an *in vitro* ubiquitylation reaction in the presence of either wild-type (lane 2) or Met-Ub (lane 3) that can only support mono-ubiquitylation. Ubiquitylated Itch was detected by IB using anti-ubiquitin antibody.

To validate the intermolecular mechanism of Itch auto-catalysis, we performed *in vivo* pull-down assays using differently tagged-Itch molecules as protein interactors. Reciprocal binding assays revealed that Itch is indeed able to establish intermolecular interactions (Fig. 1B, lane 8, and data not shown).

To assess the nature of Itch-catalyzed self-ubiquitylation, we utilized methylated ubiquitin (Met-Ub), whose modification prevents the elongation of polyubiquitin chains, in a cell-free conjugation assay. The high molecular weight ubiquitin conjugates formed through the incorporation of wild-type ubiquitin were completely abolished in the presence of Met-Ub (Fig. 1C, compare lane 2 and 3), thus demonstrating that Itch is self-modified by polyubiquitylation.

3.2. Itch generates self-assembled polyubiquitin chains that require internal Lys residue 63 of ubiquitin

We next sought to determine the type of self-polyubiquitin chains generated by Itch. Utilizing an *in vitro* ubiquitylation assay, we found that immunopurified Itch is still able to catalyze its own ubiquitylation in the presence of a ubiquitin mutant lacking Lys48 (K48R-Ub) (Fig. 2A, lane 3). Similarly to a ubiquitin mutant lacking all Lys residues (K0-Ub), substitution of Lys63 with Arg (K63R-Ub) failed to support Itch auto-ubiquitylation (Fig. 2A, compare lanes 4 and 6). On the contrary, recombinant ubiquitin lacking all Lys residues but Lys63 (K63-Ub) was properly incorporated into self-polyubiquitin chains (Fig. 2A, lane 5). The relative increase in ubiquitin conjugates observed in the presence of K63-Ub (lane 5) could be explained by assuming that under *in vitro* conditions, Lys residues other than Lys63 could be partially utilized for polyubiquitin chain formation. These results indicate that Itch auto-ubiquitylation occurs through Lys63-linked polyubiquitin.

To rule out the possibility that Lys63-linkages were catalyzed by a different E3 activity co-immunoprecipitating with Itch, we tested the ability of bacterially purified Itch to promote its own ubiquitylation in the presence of the aforementioned ubiquitin mutants. We indeed observed that the formation of polyubiquitin chains was abolished only by using the K63R-Ub mutant (Fig. 2B, lane 8), while Itch self-ubiquitylation was retained in the presence of K48R-Ub (Fig. 2B, lane 7).

Mass spectrometry (MS) analysis of the self-polyubiquitin chains generated in an *in vitro* ubiquitylation assay confirmed that Lys63 of ubiquitin was the most abundant ubiquitylated species (Alessi and Zagorska, personal communication). All together, these findings demonstrate that Itch catalyzes the generation of self-ubiquitin chains that involve Lys63 of ubiquitin.

3.3. Itch is a stable protein

The inability of Itch to synthesize its own K48-based polyubiquitin chains, which is the signal for proteasome recognition, prompted us to analyze the half-life of endogenous Itch. We found that Itch is a highly stable polypeptide, whose decay rate is not appreciable up to 8 h of protein synthesis blockade (Fig. 3A). On the contrary, p21 protein levels declined 1 h after treatment (Fig. 3A). Furthermore, the steady state levels of endogenous Itch were not altered by either incubation with the proteasome inhibitor MG132, or following exposure to a panel of inhibitors of lysosomal hydrolases (Fig. 3B). Collectively, these findings indicate that endogenous Itch degradation is a relatively slow process. Under our conditions, Itch protein levels are not significantly regulated by either proteasome-dependent degradation or by lysosomal activities, and are unlikely governed by self-ubiquitylation occurring *in vivo*.

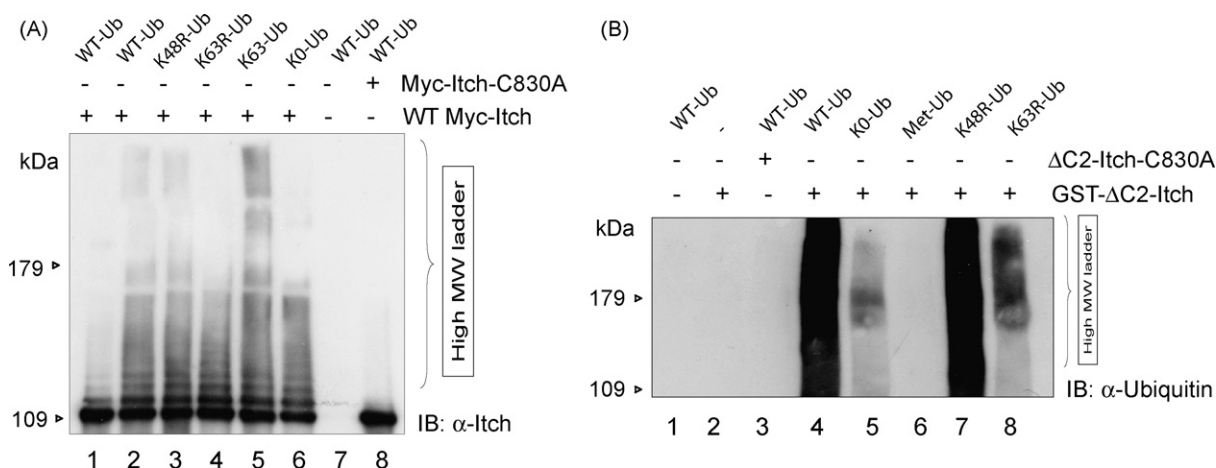


Fig. 2 – Itch self-polyubiquitylation involves Lys63 linkages. (A) HEK293T cells were transfected with plasmids coding wild-type and C830A catalytic inactive Itch. After cell lysis, Itch was immunoprecipitated with anti-myc antibody, followed by an *in vitro* ubiquitylation assay. The ubiquitylation reaction was carried out using WT (lanes 1, 2, 7 and 8), K48R (lane 3), K63R (lane 4), K63 (lane 5), or K0 (lane 6) ubiquitin mutants for 90 min at 30 °C. As a negative control, the ubiquitylation reaction was stopped prior incubation at 30 °C (lane 1). Itch ubiquitylated forms were detected by IB using anti-Itch antibody. (B) Bacterially purified GST wild-type and C830A ΔC2Itch fusion proteins were subjected to an *in vitro* ubiquitylation assay in the presence of WT-Ub (lanes 1, 3, and 4), K0-Ub (lane 5), Met-Ub (lane 6), K48R-Ub (lane 7), or K63R-Ub (lane 8). The assay was analyzed by IB using anti-ubiquitin antibody.

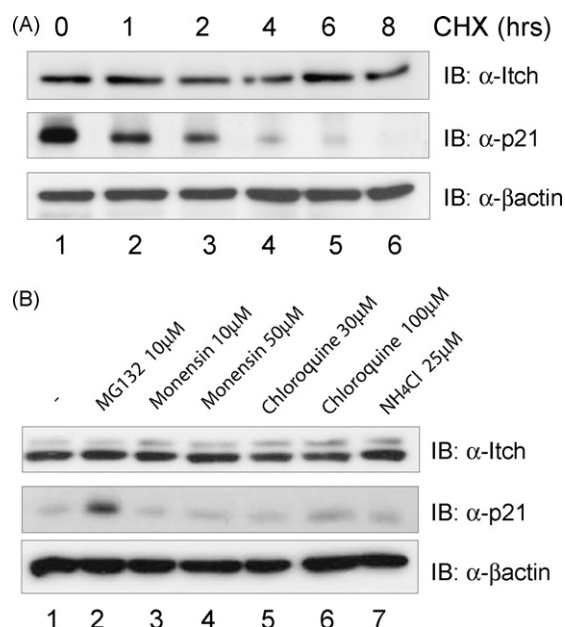


Fig. 3 – The steady state degradation of Itch is a relatively slow process. (A) Determination of endogenous Itch protein half-life. HEK293T were treated with CHX (80 μg/ml) for the indicated time points. Cell lysates were analyzed by IB using anti-Itch, anti-p21 (as a positive control for protein synthesis blockade) and anti-β-actin antibodies. **(B) Effect of proteasome and lysosomal inhibitors on the steady-state level of endogenous Itch.** HEK293T cells were treated with proteasomal (MG132, lane 2) and lysosomal hydrolases (monensin, chloroquine and NH₄Cl, lanes 3–7) inhibitors at the indicated concentrations for 6 h. Endogenous Itch steady-state levels were determined by IB with anti-Itch antibody. Protein levels of the cell cycle inhibitor p21 were assessed as a positive control for proteasomal degradation.

3.4. Itch self-ubiquitylating activity of is not required for its degradation

To further rule out the involvement of Itch auto-ubiquitylating activity in the regulation of its degradation, we reconstituted Itch deficient MEFs with either wild-type or C830A mutant Itch, and their steady-state levels were monitored in the absence or in the presence of the proteasome inhibitor MG132. As shown in Fig. 4A, the two proteins display similar expression levels, and were equally insensitive to proteasome inhibition. As an internal control, we measured p21 and c-Jun induction in response to MG132 treatment. This result confirms that lack of enzymatic activity does not affect Itch protein stabilization. A comparison of their decay rate revealed that wild-type and C830A Itch are both highly stable polypeptides (Fig. 4B).

4. Discussion

Though Itch auto-ubiquitylation has been previously reported, we have further characterized the molecular mechanisms

underlying this post-translational modification. In the present study, we provide evidences that Itch engages an intermolecular reaction generating Lys63 polyubiquitin chains, and that this auto-modification does not regulate Itch protein stability.

Consistently with the nonproteolytic self-ubiquitylating activity of Itch, the catalytic inactive C830A mutant was as stable as the wild-type counterpart, and displayed similar sensitivity to the proteasome inhibitor treatment. All together, these findings definitely prove that, in contrast to other E3s [22,23], the self-polyubiquitin chains generated by Itch do not serve as either proteasome or lysosome targeting.

The apparent discrepancy of our conclusions with the stabilizing activity manifested by the deubiquitylating enzyme USP9X on Itch protein levels [20], may be explained by assuming that Itch may serve as a substrate for other not yet discovered E3s, and that the ubiquitin protease would utilize alternative non-self-catalyzed ubiquitin chains as a substrate. In support of this notion, USP9X displays specificity for polyubiquitin chains formed through different linkages, including Lys63 [31], Lys29 and Lys33 [30], and possibly Lys48 [32,33] bonds.

The analysis of the primary structure of Itch reveals that different lysine residues are spread along the entire protein. In an effort to determine the ubiquitin Lys acceptor sites targeted for protein auto-ubiquitylation through a MS approach, six self-modified Lys residues have been identified (Alessi and Zagorska, personal communication). The analysis of Itch mutants, in which those Lys have been replaced to Arg, did not show any significant difference in their self-ubiquitylating capacity as compared to the wild-type protein. This result might likely reflect the fact that the extent of protein coverage by MS was not complete. Moreover, the inability of Itch to catalyze discrete mono-ubiquitylated bands in the presence of Met-Ub and the K0-Ub mutant, confirms that different Lys residues of Itch can be utilized as acceptor sites for ubiquitin transfer. Without the knowledge of the specific Lys residues acting as polyubiquitin chains anchors, there is an open question remaining about the possible role(s) of Itch self-modification.

Though HECT-type E3s have been considered to be constitutively active and regulated only at the level of target binding, there is emerging evidence showing that they are finely controlled either by phosphorylation [16,34] or through the association with adaptor proteins [35,21]. It is time to speculate that auto-ubiquitylation could serve as a further regulatory mechanism, which may affect Itch function at different levels. One possibility would be direct interference with its catalytic activity. Alternatively, self-ubiquitylation could induce a conformational change influencing the post-translational modification pattern of Itch. For instance, upon ubiquitylation, Itch phosphorylation state could be modified, hence allowing an alteration of the inhibitory intramolecular interactions regulating its catalytic activation [19]. As a result of both molecular mechanisms, Itch capacity to conjugate ubiquitin to protein targets would be affected. A similar outcome for self-ubiquitylation has been described by Ben-Saadon et al. [24], reporting that the ability of the RING-finger E3 Ring1B to monoubiquitylate histone H2A is increased upon generation of self-atypical Lys6, Lys27 and Lys48 mixed ubiquitin chains. In addition, Lys63-linked auto-ubiquitylation

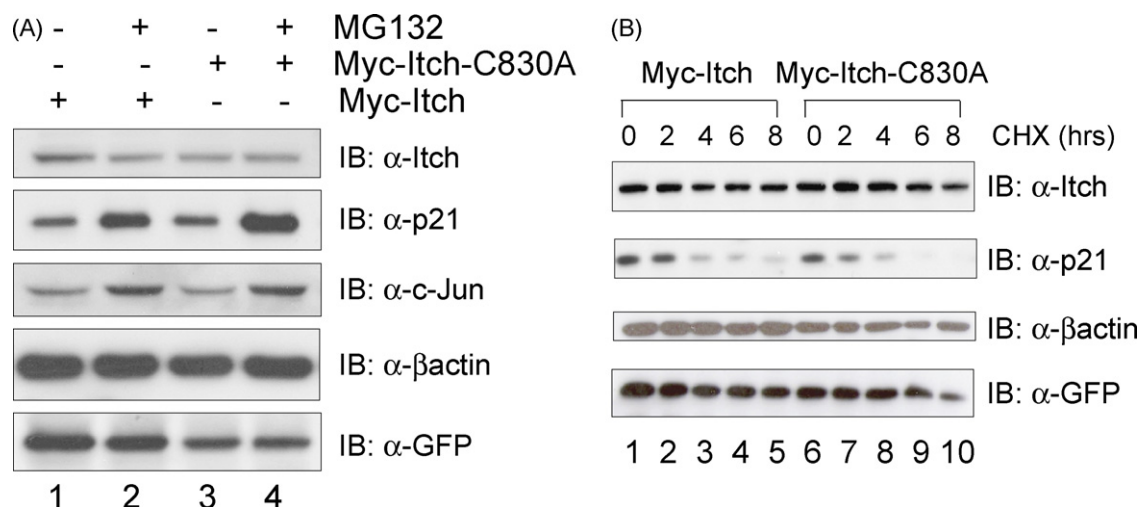


Fig. 4 – Lack of self-ubiquitylating activity does not affect Itch protein stability. (A) Effect of the proteasome inhibition on the steady-state levels of wild-type and C830A catalytic inactive Itch. *Itch*^{-/-} MEFs were co-transfected with GFP along with either wild-type or C830A catalytic inactive mutant myc-Itch. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 20 μ M MG132 for 5 h, harvested and analyzed by IB by using anti-Itch antibody. GFP proteins levels were used to normalize transfection efficiency. **(B) Protein decay rates of wild-type and C830A mutant Itch.** *Itch*^{-/-} MEFs were transfected as indicated in panel A. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 80 μ g/ml CHX for the indicated times. Cell lysates have been examined by IB using anti-Itch antibody.

of TRAF6 is required for its ability to ubiquitylate NEMO, and for subsequent IKK and NF- κ B activation [36].

Both mono- and poly-ubiquitylation of protein substrates have been associated with internalization, sorting and changes in their subcellular localization [27,37,38]. Hence, ubiquitin conjugation may represent a signal for Itch to translocate to distinct cellular compartments, which ultimately, would modify its accessibility to certain substrate molecules. Itch is predominantly localized to early and late endosomal compartments and lysosomes, though a small fraction displays a perinuclear and nuclear distribution [11,20]. Numerous Itch substrates are transcription factors mainly residing in the nuclear compartment. Hence, self-ubiquitylation may represent an auto-regulatory mechanism controlling Itch cytoplasmic-nuclear shuffling.

Efforts are underway to examine the possible contribution of Itch auto-catalytic ubiquitylation to these processes.

A significant number of Itch molecular targets are important regulators of apoptotic cell death [16,8,9]. As a result, their inappropriate removal, due to altered Itch regulation would be likely linked to cellular transformation. It is therefore crucial to unveil the physiological relevance of Itch self-ubiquitylation.

Acknowledgements

We are grateful to Dario Alessi and Anna Zagorska for fruitful discussions and for sharing of reagents and results. This work has been supported by EU-Grant EPISTEM (LSHB-CT-019067); “Alleanza contro il Cancro” Grant (ACC12); the MIUR/PRIN grant RBIP06LCA9_0023; the AIRC grant 1338; Grant Telethon GGPO4110 and Programma Italia-USA”

N526D5 awarded to G.M. Research described in this article was also supported in part by Philip Morris USA Inc. and Philip Morris International.

REFERENCES

- [1] 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 USA* 1995;92:5249.
- [2] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994;79:13–21.
- [3] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425–79.
- [4] Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ* 2005;12:1178–90.
- [5] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 2005;12:1191–7.
- [6] Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Mario Rossi M, et al. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ* 2008;15:1103–12.
- [7] 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.
- [8] Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, et al. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J* 2005;24:836–48.
- [9] Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, et al. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 2006;124:601–13.

- [10] Sundvall M, Korhonen A, Paatero I, Gaudio E, Melino G, Croce CM, et al. Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:4162–7.
- [11] 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;5:709–22.
- [12] 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;15:825–31.
- [13] 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;25:5659–69.
- [14] Venuprasad K, Huang H, Harada Y, Elly C, Subramaniam M, Spelsberg T, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol* 2008;9:245–53.
- [15] Rossi M, Aqeilan RI, Neale M, Candi E, Salomoni P, Knight RA, et al. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12753–8.
- [16] Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, et al. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 2004;306:271–5.
- [17] Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, et al. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 2005;123:409–21.
- [18] Woelk T, Oldrini B, Maspero E, Confalonieri S, Cavallaro E, Di Fiore PP, et al. Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol* 2006;8:1246–54.
- [19] 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 USA* 2006;103:1717–22.
- [20] Mouchantaf R, Azakir BA, McPherson PS, Millard SM, Wood SA, Angers A. The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitinated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *J Biol Chem* 2006;281:38738–47.
- [21] Oberst A, Malatesta M, Aqeilan RI, Rossi M, Salomoni P, Murillas R, et al. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11280–5.
- [22] Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000;288:874–7.
- [23] Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 2000;275:8945–51.
- [24] Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, Ciechanover A. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Mol Cell* 2006;24:701–11.
- [25] Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 2003;21:921–6.
- [26] Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103:351–61.
- [27] Geetha T, Kenchappa RS, Wooten MW, Carter BD. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* 2005;24:3859–68.
- [28] Herman-Bachinsky Y, Ryoo HD, Ciechanover A, Gonen H. Regulation of the Drosophila ubiquitin ligase DIAP1 is mediated via several distinct ubiquitin system pathways. *Cell Death Differ* 2007;14:861–71.
- [29] Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001;412:346–51.
- [30] Al-Hakim AK, Zagorska A, Chapman L, Deak M, Pegg M, Alessi DR. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J* 2008;411:249–60.
- [31] Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* 2005;310:1499–504.
- [32] Taya S, Yamamoto T, Kano K, Kawano Y, Iwamatsu A, Tsuchiya T, et al. The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *J Cell Biol* 1998;142:1053–62.
- [33] Chen X, Zhang B, Fischer JA. A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: liquid facets is the substrate of Fat facets. *Genes Dev* 2002;16:289–94.
- [34] Yang C, Zhou W, Jeon MS, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, et al. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol Cell* 2006;21:135–41.
- [35] McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 2003;278:23196–203.
- [36] Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG. Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J Biol Chem* 2007;282:4102–12.
- [37] Geetha T, Jiang J, Wooten MW. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 2005;20:301–12.
- [38] Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 2007;128:141–56.