



**UNIVERSITA' degli STUDI DI
ROMA "TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

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

2007 – XIX ciclo

***STUDIO FUNZIONALE DELLA
TRANSGLUTAMINASI 3 E DI p63
NEL DIFFERENZIAMENTO
EPIDERMICO MEDIANTE L'USO DI
MODELLI MURINI***

Loredana Zocchi

Docente Guida *prof. G. Melino*

Coordinatore *prof. A. Finazzi-Agrò*

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE E SCIENZE BIOCHIMICHE
VIA MONTPELLIER,1 00133 ROMA

INDICE

INDICE	I
RINGRAZIAMENTI	VII
RIASSUNTO	IX
ABSTRACT	XIII
PAROLE CHIAVE	XIX

1. INTRODUZIONE

• 1.1 L'epidermide	1
• 1.2 Struttura dell'epidermide	3
• 1.3 Aspetti biochimici del differenziamento epidermico	4
• 1.4 Le proteine dell'involucro corneo	7
• 1.4.1 Le proteine ricche in cisteina	10
• 1.4.2 Il citoscheletro di cheratine	16
• 1.4.3 I lipidi sintetizzati nei cheratinociti e la componente lipidica dell'involucro corneo	20
• 1.5 Assemblaggio dell'involucro corneo	21
• 1.5.1 Iniziazione.....	21
• 1.5.2 Formazione dell'involucro lipidico	21
• 1.5.3 Consolidamento	23
• 1.6 Ruolo delle proteasi e dei loro inibitori nell'epidermide.....	25
• 1.7 Le Transglutaminasi.....	27
• 1.7.1 Meccanismo catalitico.....	31
• 1.7.2 Struttura, organizzazione gnomica ed evoluzione delle TGasi	34
• 1.8. Transglutaminasi epidermiche	39
• 1.8.1 La TGasi 1 o TGasi cheratinocitica.....	39
• 1.8.2 La TGasi 3 o TGasi epidermica	41
• 1.8.3 La TGasi 5 o TGasi X.....	43
• 1.8.4 TGasi 2 o TGasi tissutale	49
• 1.8.5 Altri membri della famiglia delle TGasi	50
• 1.9 Malattie genetiche in relazione con l'involucro corneo	54
• 1.9.1 Malattie genetiche relative alle TGasi.....	55
• 1.9.2 Ittiosi Lamellare	55
• 1.9.3 Acral Peeling Skin Syndrome	56

INDICE

- **2.1 Mus musculus come modello nella ricerca 57**
- 2.2 Background genetico nelle linee murine 57
- 2.3 Generazione di chimere da cellule staminali embrionali..... 59
- 2.4 Ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali
murine 61
- 2.5 Classi di vettori per la ricombinazione..... 61
- 2.6 Introduzione di piccole mutazioni attraverso la creazione di topi
“knock-out” 61
- 2.6.1 “Hit and run” 63
- 2.6.2 “Tag and exchange” 63
- 2.7 Creazione di topi “knock-in” 65
- 2.8 Grandi delezioni o riarrangiamenti cromosomici: creazione di
topi “knock-out” condizionaliFattore XIIIa o TGasi plasmatica..... 67
- 2.8.1 Creazione di topi “knock-out” 67
- 2.9 Il sistema Cre/loxP 67
- 2.9.1 Creazione di topi “knock-out” condizionali con il sistema
Cre/loxP 69
- **3.1 Il differenziamento epidermico: un esempio di morte
cellulare programmata 73**
- 3.2 L’apoptosi 73
- 3.3 La famiglia di proteine Bcl-2 74
- 3.4 Le caspasi 74
- 3.5 La via intrinseca ed estrinseca dell’apoptosi 76
- 3.5.1 La via intrinseca dell’apoptosi 76
- 3.5.2 La via estrinseca 78
- **3.6 Il gene p63: dalla morte cellulare programmata al
differenziamento epidermico..... 79**
- 3.6.1 La funzione di p63 come fattore di trascrizione 79
- 3.6.2 p63: il gene e la struttura proteica 80
- 3.6.3 La funzione di p63 negli epiteli: i modelli animali 82
- 3.6.4 Le ipotesi sulla funzione di p63 e delle sue isoforme durante lo
sviluppo embrionale 82
- **3.7 Risposta cellulare allo stress: un problema di vita o di
morte 85**
- 3.7.1 Il reticolo endoplasmatico 85
- 3.7.2 Stress del reticolo endoplasmatico ed apoptosi 85
- 3.7.3 Fase I: attivazione dei sensori di stress cellulari 87
- 3.7.4 Fase II: commissionamento dell’apoptosi indotta da stress del
reticolo endoplasmatico 89
- 3.7.5 Fase III: esecuzione della morte cellulare 92

INDICE

- **3.8 Scotin: una nuova proteina pro-apoptotica espressa nel reticolo endoplasmatico** 92
- 3.8.1 *Scotin*: struttura del gene..... 92
- 3.8.2 Scotin e p53..... 92
- 3.8.3 Scotin e lo stress del reticolo endoplasmatico..... 94
- 3.9 Scotin e p73..... 94

SCOPO DELLA TESI..... 99

4. RISULTATI

- **4.1 Isolamento di nuove varianti di splicing per la transglutaminasi 3** 105
- 4.1.1. Espressione delle TGasi epidermiche in differenti tessuti ed organi murini..... 105
- 4.2 Isolamento della variante di splicing $\Delta 6\Delta 7$ della TGasi 3 murina 107
- 4.2.1 Isolamento della variante di splicing $\Delta 9\Delta 10$ della TGasi 3 umana..... 110
- 4.2.2 Attività GTPasica e di “cross-linking” nelle varianti di splicing isolate..... 110
- **4.3 Utilizzo del sistema Cre/loxP per la generazione di topi knock-out condizionali per la TGasi 3** 116
- 4.3.1 Rappresentazione schematica del vettore mTG3-cKO 116
- 4.3.2 Realizzazione del vettore mTG3-cKO: clonaggio del braccio di ricombinazione al 5'..... 118
- 4.3.3 Inserimento della cassetta della neomicina nel vettore mTG3-cKO..... 118
- 4.3.4 Inserimento della cassetta della timidina chinasi 120
- 4.4 Analisi dei cloni di cellule ES ottenuti dopo l'elettroporazione con il vettore mG3c-KO..... 120
- 4.4.1. Analisi dei cloni di cellule staminali dopo l'elettroporazione..... 120
- 4.4.2 Test sulla funzionalità dei primers mediante clonaggio del positivo di PCR..... 123
- 4.4.3 Analisi delle cellule ES dopo l'elettroporazione 123
- 4.4.4. Southern blot sul clone positivo isolato mediante PCR 125
- 4.4.5 Generazione delle chimere dopo l'iniezione del clone E4 su embrioni murini allo stadio di blastocisti 130

INDICE

- 4.5 Clonaggio di parte del DNA genomico del gene *TGM3* in un nuovo vettore per la ricombinazione omologa 133
- 4.5.1 Descrizione del vettore prescelto per la realizzazione di topi TG3 knock-out condizionali 133
- 4.5.2 Clonaggio di una porzione del gene *TGM3* all'interno di pFRLT1 134
- **4.6 Scotin: un nuovo gene “target” di p63 espresso durante il differenziamento epidermico 137**
- 4.6.1 L'espressione esogena di Scotin induce quella di GADD153 137
- 4.6.2 p63 è in grado di regolare la trascrizione di Scotin 137
- 4.6.3 Espressione di Scotin e GADD153 nella linea cellulare HaCat 139
- 4.6.4 Scotin è espresso nell'epidermide di topi selvatici 142
- 4.6.5 Analisi dell'espressione di Scotin in una linea epiteliale umana 142

DISCUSSIONE 151

MATERIALI E METODI

- **5.1 Isolamento delle varianti di splicing**
- 5.1.1 Clonaggio del cDNA murino della TGasi 3 mediante RT-PCR 159
- 5.1.2 Clonaggio del cDNA umano della TGasi 3 mediante PCR... 159
- 5.1.3 PCR quantitativa 160
- 5.1.4 Le linee cellulari e trasfezioni 160
- 5.1.5 Western blots 161
- 5.1.6 Misura dell'attività transglutaminasica 161
- **5.2 Vettori per la ricombinazione omologa e PCR 162**
- 5.2.1 PCR sui differenti organi e tessuti murini 162
- 5.2.2 Clonaggi per la realizzazione del vettore mTG3-cKO 162
- 5.2.3 Clonaggio in pFRLT1 163
- 5.3 Clonaggio del positivo di PCR per il vettore mTG3-cKO 164
- 5.4 PCR per l'analisi dei cloni di cellule ES dopo l'elettroporazione 164
- 5.5 PCR per lo screening della ricombinazione al 3' 165
- 5.6 Southern blot 165
- 5.6.1 Sonde utilizzate per l'esperimento di Southern blot 165
- **5.7 Immunofluorescenze, colture cellulari e PCR nello studio di Scotin e p63**
- 5.7.1 RT-qPCR 166

INDICE

- 5.8 Cheratinociti primari e colture cellulari 166
- 5.9 Microscopia confocale 167
- 5.9.1 Trasfezioni e Western blot 167

BIBLIOGRAFIA..... 173

CURRICULUM VITAE..... 203

PUBBLICAZIONI

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento è sicuramente rivolto al prof. Gerry Melino per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi presso il suo laboratorio. Desidero inoltre ringraziare il dott. Alessandro Terrinoni, mio supervisore in questo progetto di ricerca e la dott. Eleonora Candi per le interessanti discussioni scientifiche ed i sempre utili consigli. Un ringraziamento è inoltre rivolto anche alla dott. Francesca Bernassola ed al dott. Vincenzo De Laurenzi per i loro suggerimenti.

A questo punto non posso non rivolgere un sentito ringraziamento a quelli che sono stati i miei compagni di “viaggio” durante questi anni e siccome non sono pochi nel caso la mia memoria corta ne salti qualcuno vi includo anticipatamente in questo ringraziamento collettivo. Scendendo poi nel particolare non posso non ringraziare: Andrea per il sempre utile aiuto, le discussioni scientifiche e non, la simpatia e per aver cercato di ampliare (con successo?) la mia già “vasta” conoscenza musicale e stradale. Un grazie anche ad Anna Maria per i sempre validi ed utili suggerimenti (scientifici e non), la disponibilità e l’amicizia, ma soprattutto per il mitico ed insostituibile agriturismo “Lena”. Ringrazio inoltre Alessandro per i suggerimenti, soprattutto quelli iniziali con le cellule e lo stabulario, ma anche per l’amicizia e Valentina mia compagna “transglutaminasica” e di stabulario. Non posso non ringraziare inoltre Marco per l’aiuto al confocale, per la disponibilità e per quel suo “catastrofismo/terrorismo” che ormai non spaventa più nessuno. Un grazie anche a Martina per le uscite, per l’avventura in Toscana e Flavia per i buoni “cocktails” e le uscite ed Angelo il post-doc “americano”. Non posso ovviamente non ringraziare Margherita e Cesare per gli ordini, le discussioni calcistiche e la simpatia. Desidero inoltre ringraziare Andrea (Paradisi) con il quale ho cominciato a lavorare durante i primi mesi del mio dottorato, Aida per la sua solarità e positività e Bruno (l’unico francese a cui non piace il vino!). Un grazie anche ad Anissa, componente come me del “mitico” ciclo XIX di dottorato e Sabrina per i suoi sempre buoni manicaretti! Un ringraziamento sentito anche a Lucilla ed Antonella, (soprattutto per le penne prese in prestito in D27), Alessia, Alessandro III per la simpatia, le sezioni e per “previously on...”, Rita per l’efficace opera di contenimento dell’entropia “ranalliana”, Pia per l’avventura in Toscana. Il ringraziamento finale, ma non per questo meno importante, è rivolto alla mia famiglia ed a Mauro per la fiducia ed il sostegno che mi avete sempre dimostrato.

RIASSUNTO

Il differenziamento epidermico prevede la migrazione dei cheratinociti dallo strato basale dell'epidermide a quelli sopra basali fino al raggiungimento dello strato più superficiale dove formano l'involucro corneo. Durante questo processo i futuri corneociti subiscono una serie di cambiamenti nella loro struttura e tali modifiche sono mediate dagli enzimi transglutaminasi. Le transglutaminasi (TGasi) rappresentano una famiglia di enzimi funzionalmente e strutturalmente correlati che catalizzano la reazione di trasferimento acilico Ca^{2+} -dipendente tra il gruppo γ -carbossiamidico di residui di glutammina e il gruppo amminico di varie ammine primarie. Quando la reazione di trasferimento acilico riguarda il gruppo γ -carbossiamidico di glutammina ed il gruppo ϵ -amminico di lisina, il risultato è la formazione di un legame isopeptidico ϵ -(γ -glutamyl)lisina. In questo modo le transglutaminasi catalizzano la formazione di legami crociati (cross-linking) fra proteine che compongono l'involucro corneo come la loricrina, l'involucrina la tricoialina o le piccole proteine ricche in prolina promuovendo la formazione di macromolecole ad alto peso molecolare, stabili e molto insolubili. Quattro sono le TGasi espresse a livello epidermico (TGasi 1, TGasi 2, TGasi 3 e TGasi 5) e tutte, esclusa la TGasi 1, mostrano anche un'attività GTPasica. Topi knock-out per la TGasi 1 presentano severe anomalie a livello epidermico e muoiono subito dopo la nascita. L'importanza della TGasi 1 in un corretto differenziamento epidermico è evidente in alcune situazioni patologiche per l'uomo. Mutazioni nel gene *TGMI* causano un disturbo congenito, non letale, della cheratinizzazione denominato ittiosi lamellare. Questa malattia si trasmette in maniera autosomica recessiva e causa nell'uomo la formazione di una pelle sottile, squamosa e molto fragile ad elevato rischio di infezioni. Topi TG2 $-/-$ non mostrano invece alcuna anomalia a livello epidermico. La ridondanza genica nel numero dei membri di questa famiglia potrebbe originare una compensazione da parte di un'altra TGasi epidermica nei topi TG2 $-/-$ supplendo così all'assenza di tale gene. Nello strato basale dell'epidermide svolge invece una funzione molto importante il gene p63. Quest'ultimo è un membro della famiglia di p53, la cui trascrizione da due differenti promotori origina due differenti proteine: TAp63 che contiene un dominio di transattivazione all'N-terminale e ΔNp63 che non lo possiede. Tale dominio è importante per l'attivazione dei geni bersaglio che presentano un motivo di legame per p63 di conseguenza TAp63 è

RIASSUNTO

considerato l'attivatore trascrizionale dei geni indotti durante il differenziamento, mentre l'espressione di $\Delta Np63$ potrebbe essere correlata con il mantenimento dell'attività proliferante delle cellule staminali epidermiche localizzate nella membrana basale. Ognuna di queste due isoforme va inoltre incontro a splicing alternativo al C-terminale originando tre differenti varianti di splicing: α , β , γ .

Lo scopo di questo progetto di ricerca è sia quello di fornire nuove conoscenze sul ruolo svolto dalla TGasi 3 durante il differenziamento epidermico che quello di individuare nuovi geni la cui attività risulta essere regolata da p63. Per quanto riguarda la TGasi 3 abbiamo deciso di realizzare topi knock-out condizionali attraverso l'utilizzo della ricombinasi Cre e dei siti *loxP*. Tale sistema consente infatti l'eliminazione tessuto-specifica dell'espressione del gene bersaglio. Dati preliminari da noi condotti hanno infatti dimostrato come la TGasi 3 sia espressa nello strato sopra basale dell'epidermide, ma il suo trascritto risulta essere presente anche nel cervello. Abbiamo così realizzato un primo costrutto da utilizzare per l'elettroporazione nelle cellule staminali murine (ES). L'analisi dei cloni ottenuti ha permesso l'isolamento di un potenziale clone positivo che è stato utilizzato per la creazione delle chimere. Il reincrocio di queste ultime con topi selvatici e l'analisi della progenie ottenuta ci consentirà di validare definitivamente la positività del clone prescelto procedendo così nella creazione di topi knock-out condizionali per la TGasi 3. Parallelamente, utilizzando un vettore di nuova generazione, abbiamo preparato un nuovo costrutto per la creazione di tali topi. Dopo l'elettroporazione nelle cellule ES è in corso l'analisi dei cloni ottenuti. Durante gli esperimenti preliminari per la creazione di tali topi abbiamo inoltre scoperto due nuove varianti di splicing per il gene *TGM3*. La prima, denominata $\Delta 6\Delta 7$, isolata nel topo manca della cisteina catalitica e sia l'attività di cross-linking che quella GTPasica risultano essere compromesse. La variante $\Delta 9\Delta 10$, isolata nell'uomo, pur conservando intatta la triade catalitica presenta una bassa attività transamidasi. Per quanto riguarda invece l'attività GTPasica anche quest'ultima risulta essere compromessa in seguito alla perdita di importanti residui coinvolti nella formazione della tasca legante il GTP.

Nella seconda parte di questo lavoro di tesi abbiamo invece identificato un nuovo gene bersaglio denominato *Scotin*, la cui espressione risulta essere regolata *in vitro* dall'isoforma TA, non quella ΔN , che sembra esercitare invece un'attività inibitoria sulla trascrizione di tale gene. L'espressione di *Scotin* è localizzata nel reticolo endoplasmatico e nell'involucro nucleare. Esso è inoltre in grado di promuovere l'apoptosi attraverso l'induzione di

RIASSUNTO

stress del reticolo endoplasmatico. Dati ottenuti sia dall'analisi di colture epiteliali secondarie (HaCat), ma soprattutto da cheratinociti murini hanno evidenziato una forte attivazione di questo gene durante il differenziamento epidermico. Esperimenti di immunofluorescenza condotti su sezioni di topi selvatici hanno messo in evidenza come Scotin sia espresso nello strato sopra basale dell'epidermide in parallelo con TAp63. Non è stata invece rilevata alcuna espressione nello strato basale di questo gene, dove risulta essere fortemente espressa l'isoforma ΔN di p63. I dati ottenuti dalle colture primarie murine sono stati validati anche da linee primarie umane epiteliali (NHEK). Nelle NHEK è stato infatti possibile confermare la crescente espressione di Scotin durante il differenziamento accompagnata, come atteso, dall'incremento dell'isoforma TA e dalla diminuzione di ΔN . In conclusione i nostri dati hanno portato all'isolamento di Scotin come nuovo gene bersaglio indotto da p63 durante il differenziamento epidermico. Tale meccanismo attiva la risposta allo "stress" da parte del reticolo endoplasmatico, di cui Scotin è un induttore, correlando così per la prima volta queste due differenti vie.

ABSTRACT

Epidermal differentiation begins with the migration of keratinocytes from the basal layer and ends with the formation of the cornified layer. Cell proliferation, differentiation and death occur sequentially and each process is characterized by the expression of specific proteins. Transglutaminases (TGases) play an important role during the differentiation program. These enzymes catalyse post-translational modifications of proteins by the formation of isopeptide bonds. This occurs either through protein cross-linking via ϵ -(γ -glutamyl)lysine bonds or through incorporation of primary amines at selected peptide-bound glutamine residues. The cross-linked products, often of high molecular mass, are highly resistant to mechanical challenge and proteolytic degradation, and their accumulation is found in a number of tissues and processes where such properties are important, including skin, hair, blood clotting and wound healing. In common with many other important cellular functions found in mammalian cells, TGases require the binding of Ca^{2+} for their activity, but at concentrations normally in the supraphysiological, not the physiological, range associated with most intracellular processes. In mammals, nine distinct TGase isoenzymes have been identified at the genomic level; however, only seven have so far been isolated and characterized at the protein level, after purification either from natural sources or as recombinant proteins. Four TGases are expressed in the epidermis (TGase 1, TGase 2, TGase 3 and TGase 5) and the last three TGases show also a GTPase activity. The binding of GTP inhibits the transamidation activity of these enzymes, but allows them to function in signal transduction. In order to investigate the function of epidermal TGases two knock-out mouse model have been realised for two members of this family. *TGM1*^{-/-} knock-out mice show severe epidermal abnormalities and they die soon after birth, while *TGM2*^{-/-} knock-out mice don't show any epidermal abnormality. The redundancy in the genes number that belong to this family could justify the presence of a compensating activity furnished by other family members. During the complex mechanism that leads to epidermis formation an important role is played by the action of p63. This transcription factor, belonging to the p53 gene family, is transcribed from two different promoters, generating two classes of proteins: one containing an N-terminal transactivation domain (TA) and another that lacks this domain (ΔN). The first isoform is considered the transcriptional inducer whereas ΔN could exert a role of dominant negative. In addition alternative

ABSTRACT

splicing at the 3' end of both transcripts (TA and Δ N) generates three different C-terminal splicing variants: α , β and γ . During the last few years evidence has accumulated on the important role of p63 in the epidermal differentiation program. Mice lacking p63 show severe limb, cranofacial and skin defects and die soon after birth. Recent published data suggest the idea that Δ Np63 is important to preserve the proliferative potential of the basal layer, whereas TAp63 contributes by acting synergistically and/or subsequently to Δ Np63 to allow differentiation. TAp63 is in fact capable of inducing growth differentiation factor (GDF15) that plays an important role in the regulation of the keratinocyte differentiation.

The aim of this work is to acquire new knowledges in the complex mechanism that leads to epidermal differentiation thanks to the investigation on TGase 3 and p63 function during the skin process formation. Regarding TGase 3 we plan to create conditional knock-out mice for this enzyme using the Cre/*loxP* system. Cre is a 38 kDa product of the *cre* (cyclization recombination) gene of bacteriophage P1 and is a site-specific DNA recombinase of the Int family. Cre recognizes a 34 bp site on the P1 genome called *loxP* (locus of X-over of P1) and efficiently catalyzes reciprocal conservative DNA recombination between pairs of *loxP* sites. Cre-mediated recombination between two directly repeated *loxP* sites results in excision of the DNA between them as a covalently closed circle. Our preliminary results showed that TGase 3 is not only expressed in the skin (granulosa layer) but its transcript is also present in the brain, so it should be very useful to disrupt the expression of this gene in a tissue-specific way. After having realized the recombination vector we used it for ES cells electroporation.

We subsequently screened more than 400 clones by PCR and we were able to isolate only the clone in which total recombination event has occurred. The other positive clones showed only a partial recombination event, because they lacked of the third *loxP* site. We performed Southern blot experiments on the positive isolated clone and we used it for blastocyst injections. This led to the birth of four chimeras that subsequently were used for matings with the wild type mice. Now we are screening the offspring in order to continue the experiments for the creation of the conditional knock-out mice. New electroporations were performed using another recombination vector in order to enhance the number of positive ES cells and we are analyzing the ES electroporated clones. During our work we isolated also two novel splicing variants for the *TGM3* gene. The first one, isolated in mouse, lacks exons six and seven ($\Delta 6\Delta 7$) and consequently it is deprived of the catalytic cysteine located in exon six. The second one, isolated in NHEK cells and in human

ABSTRACT

normal and abnormal skin biopsy, lacks of exons nine and ten ($\Delta 9\Delta 10$), but it maintains the correct frame of the gene. We performed TGase cross-linking assay *in vitro* to test the activity of the human splicing variant $\Delta 9\Delta 10$, because the catalytic triad was still preserved. The experiment demonstrated that the $\Delta 9\Delta 10$ is at least 4 times less active than the wild type one. Regarding to the GTPase, it is lost in both splicing variants because several residues, that are important for the creation of the GTP pocket, are missed. Considering the low errors frequency of the spliceosome complex and the presence of TGase 1, TGase 2 and TGase 5 splicing variants, we could hypothesize that a high degree of sequence similarity and gene organization among the members of this family could originate these non functional splicing variants.

In the second part of this work, we isolated a new p63-target gene: *Scotin*. This gene was previously isolated as a p53-inducible proapoptotic gene and the protein is located in the endoplasmic reticulum and in the nuclear membrane. Scotin expression is induced in response to endoplasmic reticulum (ER) stress in a p53 dependent or independent manner and this event lead to apoptosis. Its expression is also positively regulated by TAp73-mediated apoptosis that is another member of the p53 family. In order to investigate if p63 could be capable of inducing Scotin expression we performed RT-qPCR on Saos-2 inducible cell line. These experiments showed that Scotin transcript is positively regulated by TAp63 α *in vitro*, while ΔN isoform inhibits its expression. We detected Scotin upregulation in HaCat cell line committed to differentiate and these preliminary data were also confirmed by Western blot experiments on mouse primary keratinocytes committed to differentiate *ex vivo*. Immunofluorescence performed on mouse new born skin sections revealed that Scotin expression is located in the suprabasal layer of epidermis where TAp63 is expressed. Conversely, we did not detect Scotin expression in the basal layer where $\Delta Np63$ is strongly expressed. These data were also confirmed by analysis performed on human epithelial primary keratinocytes (NHEK). We found, as expected, Scotin upregulation at transcriptional and protein level on differentiating NHEK cells. This upregulation follows a TAp63 increase and a $\Delta Np63$ decrease. In conclusion our data lead to isolation of a new p63 target gene induced during the epithelial differentiation program, a complex process that also involves endoplasmic reticulum stress induction.

PAROLE CHIAVE

PAROLE CHIAVE: Differenziamento epidermico, p63, transglutaminasi 3, Scotin, topi knock-out

INTRODUZIONE

1.1 L'epidermide

L'epidermide, la parte più esterna, pluristratificata della cute, (Figura 1) si è evoluta per fornire agli organismi una barriera fisica, essenziale per la sopravvivenza degli organismi stessi durante il loro adattamento alla vita terrestre. Questa barriera contro l'ambiente esterno esclude le sostanze e gli organismi esterni ed impedisce la perdita dei liquidi vitali, garantendo proprietà specifiche (resistenza meccanica, elasticità, impermeabilizzazione) nei diversi distretti cutanei.

L'epidermide è un epitelio costituito da diversi strati di cellule, i cheratinociti, in successivi stadi di differenziamento terminale epiteliale, processo conosciuto anche come cheratinizzazione. I cheratinociti migrano dallo strato interno proliferante, lo strato basale, verso lo strato lo strato più differenziato nella parte esterna dell'organismo, lo strato corneo (Reichert et al., 1993). Questo rappresenta il punto terminale del differenziamento ed è costituito da cellule appiattite morte, i corneociti. La membrana plasmatica di queste è costituita da un complessa struttura nota come involucro corneo formato da filamenti di cheratina inclusi all'interno di un amalgama di proteine insolubili e di lipidi. Tali proteine sono unite covalentemente da legami crociati catalizzati da enzimi specializzati, chiamati transglutaminasi (Michel et al., 1988; Kalinin et al., 2002). La componente lipidica dell'involucro corneo si trova nella parte esterna dei corneociti. L'epidermide è continuamente rigenerata, attraverso il differenziamento dei cheratinociti, creando un equilibrio omeostatico tra la rigenerazione di nuovi cheratinociti dalle cellule staminali epidermiche, il loro differenziamento e la loro perdita (desquamazione). Il processo di cheratinizzazione è altamente organizzato, sia nello spazio che nel tempo. A livello cellulare, il processo di cheratinizzazione inizia con la sintesi e l'assemblamento sotto la membrana plasmatica di un involucro corneo di tipo immaturo. Questo involucro subisce in seguito un processo di irrobustimento per attacco di proteine specifiche attraverso legami covalenti. Alla fine di tale processo di maturazione si ottiene la struttura lipidico/proteica in grado di espletare le principali funzioni fisiologiche della pelle.

Lo scopo di questo capitolo è descrivere i meccanismi che sono coinvolti nel processo del differenziamento terminale dei cheratinociti, tale processo è un meccanismo unico di morte cellulare programmata, nettamente distinto dall'apoptosi.

INTRODUZIONE

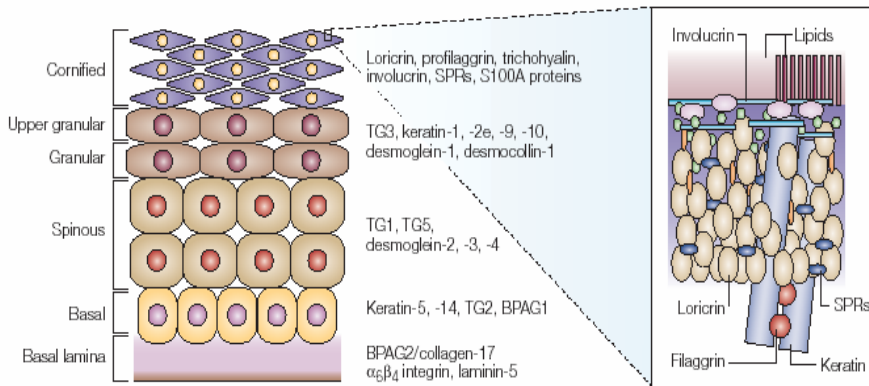


Figura 1. Struttura istologica dell'epidermide. Si notano i quattro strati che caratterizzano l'epidermide, ed i cambiamenti morfologici cui vanno incontro le cellule durante il differenziamento epidermico. Durante la sua maturazione, il cheratinocita subisce l'attivazione o l'inibizione di geni specifici di ogni strato differenziativo. L'involucro corneo è formato da una fitta rete di proteine strettamente addossate fra di loro e tenute insieme per mezzo della formazione di legami isopeptidici crociati. Da notare la predominanza delle proteine loricrina e SPRs

1.2 Struttura dell'epidermide

L'epidermide è un epitelio pavimentoso pluristratificato cheratinizzato desquamante, saldamente ancorato al derma attraverso la giunzione dermoepidermica o membrana basale. Ad un aspetto grossolanamente piatto della superficie esterna si contrappone una superficie interna caratterizzata dalla presenza di creste epidermiche interdigitate con le papille dermiche. In questo modo risulta estremamente aumentata la superficie di scambio tra derma ed epidermide e di conseguenza gli scambi metabolico-nutritivi. Il tessuto epidermico è costituito fundamentalmente da cellule epiteliali di origine ectodermica, i cheratinociti, disposte in strati sovrapposti, in cui si trovano sparse cellule di diversa origine embrionale (melanociti, cellule di Langerhans, cellule di Merkel) migrate nell'epidermide durante le prime fasi dello sviluppo e in periodi successivi alla nascita. L'epidermide è costituita da quattro strati cellulari (Figura 1), che rappresentano i quattro principali stadi differenziativi del cheratinocita: lo *strato basale*, posto sopra la membrana basale, lo *strato spinoso*, lo *strato granuloso* e, in superficie, lo *strato corneo*. In alcune regioni del corpo, dove la cute si presenta particolarmente ispessita, ad esempio a livello del palmo della mano e della pianta del piede, si può osservare un ulteriore strato tra quello granuloso e quello corneo, detto *strato lucido*. Lo strato basale rappresenta il compartimento proliferativo del tessuto ed è costituito da un monostrato di cheratinociti cuboidali fissati alla membrana basale attraverso emidesmosomi e giunzioni aderenti. I cheratinociti basali, caratterizzati da un'intensa attività mitotica, presentano un grosso nucleo ovale che occupa la maggior parte della cellula e un citoplasma in cui sono dispersi tonofilamenti, melanosomi e numerosi ribosomi liberi, caratteristici di una intensa attività metabolica. Tra i cheratinociti dello strato basale si distinguono le *cellule staminali*, di solito localizzate all'apice delle creste interpapillari, che mantengono una elevata capacità proliferativa lungo tutta la vita adulta, e le *cellule amplificatrici in modo transiente* che dopo un certo numero di divisioni (in genere da 1 a 5) vanno incontro a differenziamento epidermico terminale (Jones et al., 1993). Lo strato spinoso è costituito da diversi strati cellulari che possono variare da 5 a 10 a seconda delle regioni corporee e rappresenta il settore maturativo dell'epidermide (Saurat et al., 1990). I cheratinociti appaiono di forma poliedrica e connessi fra di loro da numerose interdigitazioni desmosomiali della membrana plasmatica che conferiscono alle cellule il loro tipico aspetto spinoso. Lo strato granuloso costituisce il settore differenziativo pre-terminale, caratterizzato

morfologicamente dalla presenza di grossi granuli irregolari detti di cheratoialina, dai corpi lamellari e granuli di Odland e da alterazioni involutive a carico dei nuclei. Questo strato, di spessore variabile, segna la transizione tra la porzione più interna dell'epidermide, costituita da cellule vive, metabolicamente attive, e quella più esterna, costituita da cellule morte. Nella porzione superiore di questo strato inizia la formazione dell'*involucro corneo cellulare*, che rappresenta il marcatore tipico del cheratinocita maturo. Lo strato corneo rappresenta il compartimento differenziativo terminale dell'epidermide (Plewig e Marples, 1970) ed è costituito da 15-20 strati di cheratinociti terminalmente differenziati (corneociti o squame cornee). I corneociti si presentano come cellule morte anucleate, strettamente cementate le une alle altre da una matrice extracellulare lipidica, con scarsi residui di organelli citoplasmatici, ed un involucro cellulare notevolmente ispessito. Gli spazi intercorneocitari, che costituiscono il 10% dello strato corneo (Saurat et al., 1990), sono riempiti da lipidi esocitati dai cheratinociti. Il processo di cheratinizzazione descritto si svolge in maniera continua con una durata media di circa un mese (in condizioni non patologiche), e assicura il ricambio dei cheratinociti persi con la desquamazione (Fuchs E., 1990). I cambiamenti morfologici descritti sono determinati da modificazioni biochimiche che riflettono un programma di attivazione e inibizione sequenziale e/o sincronizzata di prodotti genici specifici (Fig.1).

1.3 Aspetti biochimici del differenziamento epidermico

I prodotti specifici del differenziamento del cheratinocita costituiscono i componenti strutturali responsabili della proprietà meccaniche e chimiche dell'epidermide. Essi includono il citoscheletro di *filamenti intermedi di cheratina*, i *granuli cheratoialini* contenenti, in forma di precursore, la *filaggrina*, i *granuli di Odland* contenenti una miscela complessa di lipidi e le proteine dell'*involucro corneificato* (loricrina, involucrina ed altre), che sono tutti sintetizzati negli strati contenenti cellule vive e subiscono cambiamenti biochimici e nella loro organizzazione durante il processo di cheratinizzazione. Pure importanti, ai fini dell'integrità strutturale dell'epidermide, sono le componenti della membrana basale (laminine, fibronectina, collagene, etc.) che ancorano il derma all'epidermide e le proteine dei complessi di giunzione cellula-cellula e cellula-membrana (caderine, integrine, etc.). La particolare organizzazione istologica dell'epidermide deriva dall'attuazione del programma di differenziamento

INTRODUZIONE

dei cheratinociti: il meccanismo che porta una cellula basale a progredire nei vari strati dell'epidermide e a trasformarsi in lamella cornea prende il nome di *cheratinizzazione*, o *citomorfosi cornea*. L'epidermide mantiene l'omeostasi tramite una costante proliferazione di un singolo strato cellulare basale. All'interno di questo strato, si possono identificare due tipi di cellule. Da una parte, le *cellule staminali* sono in grado di generare ad ogni divisione una cellula figlia che mantiene le caratteristiche parentali, mantenendo quindi lo stato indifferenziato. D'altra parte, grazie alla capacità delle cellule staminali di rispondere a stimoli differenziativi, ad ogni ciclo viene generata anche una cellula figlia che è destinata a differenziarsi, chiamata *cellula amplificatrice transiente*. Questa cellula si divide molto rapidamente per un determinato numero di cicli, quindi si stacca dalla membrana basale e comincia il programma di differenziamento terminale (Figura 2). La cheratinizzazione è caratterizzata da cambiamenti progressivi della forma, dell'orientamento e della composizione biochimica del cheratinocita: la cellula aumenta di dimensione durante le prime fasi del differenziamento, si schiaccia progressivamente modificando, nello stesso tempo, il quadro di sintesi delle sue proteine; infine, quando raggiunge gli strati esterni della pelle, il cheratinocita ha perso la maggior parte dei suoi organelli, nucleo incluso, mentre vengono assemblate altre strutture, quali i corpi lamellari e l'involucro corneo. L'*involucro corneo* è una struttura stabile formata da diverse proteine tenute insieme da legami crociati di tipo covalente catalizzati da enzimi Ca^{+2} -dipendenti, le *transglutaminasi* (TGasi). Il prodotto finale del differenziamento del cheratinocita consiste quindi di un involucro corneo contenente macrofibrille di cheratina. Ceramidi e acidi grassi, contenuti nei corpi lamellari, vengono riversati all'esterno e risultano legati covalentemente all'involucro corneo. Il cheratinocita si è così trasformato in una lamella cornea che verrà persa dalla superficie della pelle per desquamazione. In media, l'intero processo dura 30 giorni. Le modifiche che si verificano nel cheratinocita durante il processo di maturazione terminale sono quindi dovute a variazioni dell'attività di enzimi specifici, quali le transglutaminasi, le protein-chinasi, le fosfatasi e le sulfidril-ossidasi, ed all'espressione di proteine strutturali (K1 e K10), di proteine della matrice interfilamentosa (filaggrina) e di proteine dell'involucro corneo (involucrina, loricrina, SPRs ed altre).

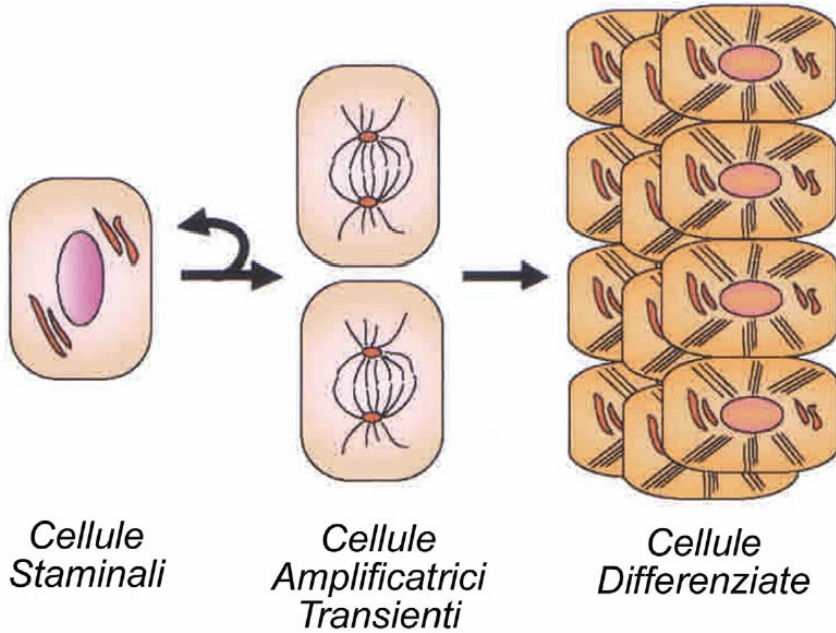


Figura 2. *Ciclo rigenerativo delle cellule staminali.* Le cellule staminali si rigenerano e producono anche le cellule amplificatrici transienti, che a loro volta creano una progenie che, durante il differenziamento, si muove verso l'alto, fino a trasformarsi nel corneocita.

1.4 Le proteine dell'involucro corneo

Il differenziamento terminale degli epitelii pluristratificati squamosi, tra cui l'epidermide, termina con la formazione di una struttura lipo-proteica altamente resistente ed insolubile, che riveste i cheratinociti differenziati, nota come involucro corneo (*Cornified Envelope*, CE). La sua costituzione inizia nello strato granuloso ed assume gradualmente una funzione protettiva a sostituzione della membrana plasmatica (Farbman, 1966). Per i morfologi, l'involucro corneo è una banda elettrondensa, detta *banda marginale*, posta sotto la membrana plasmatica del cheratinocita, che compare prima nelle cellule superficiali granulari degli epitelii squamosi stratificati che differenziano in maniera terminale (Brody, 1969; Hashimoto, 1969; Ishida-Yamamoto e Iizuka, 1995) e quindi aumenta gradualmente di spessore e densità. Gli involucri cornei maturi coprono e incorporano le placche desmosomiali e utilizzano le proteine che le costituiscono per la loro stessa costruzione (Steinert e Marekov, 1995; Robinson et al., 1997; Steinert e Marekov, 1997), formando uno strato morfologicamente uniforme di circa 15 nm di spessore nelle cellule morte che hanno completato il differenziamento (Jarnik et al., 1998). I biochimici usano il termine involucro corneo per indicare la frazione più insolubile estratta dagli epitelii squamosi stratificati, riferendosi alla massa che rimane dopo l'esauritiva rimozione delle cheratine, dei lipidi e di altri componenti solubilizzati da detergenti, agenti riducenti (come il β -mercaptoetanolo); (Sun e Green, 1976) e agenti caotropici concentrati, come urea e guanina-HCl (Steinert e Marekov, 1995; Matolsy e Matolsy, 1966). L'estrema insolubilità dell'involucro corneo *in vivo* è il risultato della polimerizzazione macromolecolare di diverse proteine cheratinocitiche, tramite formazioni di legami disulfidici e isopeptidici. Comunque, i ponti disulfidici formati dalle sulfidril-ossidasi (Yamada et al., 1987) sono persi durante le procedure di isolamento dei CE necessarie per rimuovere la grande massa di cheratine (Hohl et al., 1991). Quindi, l'involucro corneo analizzato *in vitro* è costituito in pratica da un polimero proteico macromolecolare altamente insolubile, tenuto insieme da legami isopeptidici (Hohl et al., 1990; Polakowska e Goldsmith, 1991; Reichert et al., 1993; Simon, 1994; Eckert et al., 1997), e potrebbe essere differente in qualche modo nella struttura e nella composizione dalla struttura presente *in vivo*. Nonostante questo, i frammenti di CE isolati da molti tipi di epitelii appaiono come uno strato dello spessore univormemente di 15 nm (Jarnik et al., 1998). L'involucro corneo è costituito per il 90% da proteine e per il 10% da lipidi (Swartzendruber et

al., 1989). Alcuni di questi lipidi sono legati covalentemente alle proteine dell'involucro corneo, e formano lamelle lipidiche intercellulari che contribuiscono ad esplicare la funzione di barriera protettiva dell'epidermide. Il loro ruolo nella composizione dell'involucro corneo verrà approfondito successivamente. Gli amminoacidi più abbondanti nell'involucro corneo sono: la glicina (23-33%), la serina (14-21%) e la cisteina (2-4%). La composizione varia leggermente in base al tipo di estrazione chimica e all'area del corpo da cui la cute è stata prelevata. Alla luce di queste considerazioni, un modello strutturale dell'involucro corneo (Figura 3) prevede un insieme di proteine legate covalentemente da legami isopeptidici (inter-proteina) e da ponti disolfuro. I legami isopeptidici o legami crociati che si formano tra un residuo di glutamina e uno di lisina, localizzati su due diverse catene proteiche, sono detti anche legami ϵ -(γ -glutamyl)lisina, la cui formazione è catalizzata dalle transglutaminasi. Inoltre, i legami tra bis(γ -glutamyl)poliammine e i residui di lisina contribuiscono a stabilizzare l'involucro corneo (Piacentini et al., 1988; Martinet et al., 1990). L'instaurarsi di ponti disolfuro dipende probabilmente anche dall'azione di sulfidril-ossidasi. Un enzima di 66 kDa che catalizza *in vitro* la formazione di legami disolfuro è stato isolato dall'epidermide di topo (Yamada et al., 1987). E' quindi possibile ipotizzare che esistano anche *in vivo* delle sulfidril-ossidasi coinvolte nella formazione di tali legami.

Involucrina

Il gene dell'involucrina è localizzato in un cluster genico, insieme ai geni di numerose altre proteine del CE, che formano il complesso di differenziamento epidermico (EDC, tabella 2), posto sul cromosoma 1q21 (Voltz et al., 1993; Minschke et al., 1996)

L'involucrina è una proteina che normalmente partecipa all'assemblaggio dell'involucro corneo (Rice et al., 1977), anche se può essere espressa in altri tipi cellulari di origine non epiteliale. I residui aminoacidici più abbondanti nella proteina umana sono glicina e aspartato. Analogamente ad altre proteine precursori dell'involucro corneo, l'involucrina è costituita da sequenze aminoacidiche ripetute, che hanno subito riarrangiamenti notevoli durante l'evoluzione (Eckert & Green, 1986). La struttura secondaria dell'involucrina è costituita principalmente da α -elica (Yaffe et al., 1992). L'involucrina viene utilizzata come substrato dalla TG1, che preferenzialmente utilizza i residui aminoacidici Gln495 e 496 (Simon et al.,

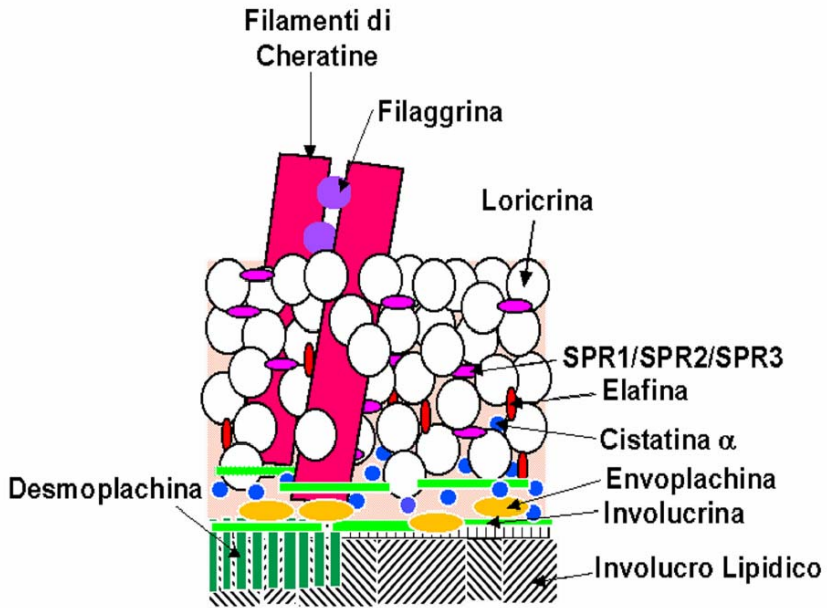


Figura 3. *Modello strutturale dell'involucro corneo.* L'involucro corneo è formato da proteine che sono legate covalentemente mediante l'attività delle transglutaminasi. La loricrina e le SPRs sono le proteine intracellulari più abbondanti, mentre l'involucro lipidico conferisce delle specifiche caratteristiche fisiche alla struttura.

1988). L'involucrina si presenta legata covalentemente a diverse proteine precursori dell'involucro corneo ed è una delle prime proteine utilizzate dalle transglutaminasi durante l'assemblaggio dell'involucro corneo e crea un'impalcatura alla quale poi si uniscono altre proteine per formare l'involucro corneo maturo. Inoltre, essendo, come detto, una delle prime proteine ad essere utilizzata dalle trasglutaminasi, si trova in prossimità della membrana plasmatica cellulare. Poiché la membrana basale viene eliminata durante il differenziamento epidermico, l'involucrina potrebbe essere la proteina alla quale i lipidi che si trovano nello spazio extra-cellulare, soprattutto le ceramidi, si legano covalentemente per formare la superficie esterna lipidica dell'involucro corneo (Nemes et al., 1999).

1.4.1. Le proteine ricche in cisteina

Il gruppo di proteine ricche in cisteina comprende diverse proteine caratterizzate dall'inconsueta abbondanza di residui di cisteina, e comprende almeno quattro membri. La *loricrina*, sintetizzata a livello dello strato granuloso, è il componente fondamentale dell'involucro cellulare (Hohl et al., 1991). La loricrina umana ha un peso molecolare teorico di 26 kDa, è caratterizzata da un elevato numero di residui di cisteina ed è insolubile in tutti gli stadi del differenziamento epidermico. L'insolubilità della loricrina dipende in parte dalla presenza di legami disolfuro e in parte dalla rapidità con cui viene assemblata nell'involucro corneo dalle transglutaminasi epidermiche (Mehrel et al., 1990). La loricrina presenta un alto contenuto di glicina (46.8%), di serina (22.8%) e di cisteina (6%). Questi amminoacidi sono anche i più abbondanti negli involucri cornei (Hohl et al., 1991), e tale somiglianza dimostra che la loricrina è il componente principale dell'involucro cellulare. Strutturalmente la loricrina può essere suddivisa in domini distinti: domini ricchi in glicina e serina separati da domini ricchi in glutamina e legati ai domini amino- e carbossi-terminali ricchi in lisina e ricchi in lisina e glutamina (Mehrel et al., 1990; Hohl et al., 1991). I residui aminoacidici di serina, glicina e cisteina sono configurati in peptidi tandem quasi ripetuti (glicinaserina-cisteina). Queste sequenze assumono una conformazione ad anello resa possibile dalla presenza di residui aromatici (fenilalanina e tirosina) ed alifatici (valina e isoleucina) tra i peptidi tandem quasi ripetuti; gli anelli aromatici tendono ad associarsi in maniera ordinata escludendo le sequenze ricche in glicina che sono così costrette a ripiegarsi (Hohl et al., 1991; Steinert et al., 1991). La stessa struttura di peptidi in

INTRODUZIONE

Tabella 2 | Precursori proteici dell'involucro corneo

Nome	Locus Genico	Grandezza	Abbondanza relativa nei CE dell'epidermide	Siti di cross-linking definiti <i>in vivo</i> ?
Involucrina	1q21 (EDC)	65	2-5%	Sì
Loricrina	1q21 (EDC)	26	80%	Sì
SPRs	1q21 (EDC)	6-26	3-5%	Sì
Cistatina α	3cen-q21	12	2-5%	Sì
Proelafina	20q12-q13	10	<1%	Sì
(Pro)filaggrina	1q21 (EDC)	>400	<1%	Sì
Cheratine di tipo II	12q13	56-60	<1%	Sì
Desmoplachina	6p21-ter	330/250	<1%	Sì
Envoplachina	17q25	210	<1%	Sì
Periplachina	16p13.3	195	<1%	Sì
Proteine S100	1q21 (EDC)	12	<1%	No
Annessina I	9q12-q21.2	36	<1%	No

EDC, epidermal differentiation complex; CE, involucro corneo. Nemes e Steinert, 1999.

tandem quasi ripetuti è presente nei domini terminali delle cheratine K1 e K10. Anche nelle cheratine queste sequenze potrebbero adottare una configurazione ad anello (Zhou et al., 1988). E' quindi possibile che le sequenze ricche in glicina e serina della loricrina e i domini terminali delle cheratine possano interagire nel corneocita e generare punti di contatto tra il citoscheletro e l'involucro corneo (Hohl et al., 1991). La loricrina viene assemblata in un involucro corneo preesistente ed ha il ruolo di "rinforzare" tale involucro e di rendere l'epidermide flessibile attraverso l'interazione con la rete di filamenti di cheratina. I domini ricchi in glutamina e in lisina-glutamina della loricrina costituiscono il substrato per le transglutaminasi. La proteina fornisce sia il residuo donatore che quello accettore di gruppi acilici. La TGasi 1 agisce sulla loricrina formando principalmente legami crociati intramolecola, generando in questo modo una molecola di loricrina più compatta, mentre la TGasi 3 forma soprattutto legami intermolecola, costituendo così dimeri o oligomeri della proteina. L'*elafina* (elastase specific inhibitor, conosciuta anche come SKALP, skin derived anti-leukopetidase) è un componente minore degli involucri cornei dell'epidermide umana adulta, è espressa in maniera transiente nell'epidermide fetale e neonatale, ma è altamente espressa nella pelle lesionata o psoriatica e nei cheratinociti in coltura (Molhuizen et al., 1993; Schalkwijk et al., 1993; Alkemade et al., 1994; Nonomura et al., 1994; Pfundt et al., 1996). La suprabasina è un gene recentemente identificato nei cheratinociti umani e murini in differenziamento (Park et al., 2002). Il cDNA che codifica per la suprabasina è stato identificato per la prima volta nell'epidermide di topo, fra lo strato proliferativo basale e le popolazioni sovrabasali in differenziamento. E' stato ipotizzato che la elafina funzioni come proteina-ponte fra le molecole di loricrina (Steinert e Marekov, 1995). Gli altri due membri della famiglia di proteine ricche in cisteina sono stati scarsamente studiati, e sono una proteina isolata dai granuli di cheratoialina con peso molecolare di 19.5 kDa (9.2% di residui di cisteina) (Matoltsy e Matoltsy, 1970) ed una proteina denominata *CREP* (*cystine-rich envelope protein*) sintetizzata a livello dello strato spinoso con peso molecolare di 16 kDa (4.3% di residui di cisteina) (Takahashi e Tezuka, 1987).

SPR

Le SPR (*small prolin-rich proteins - piccole proteine ricche in prolina*) sono una famiglia di proteine (6-18 kDa) con sequenza aminoacidica simile, ricca in Prolina. Si suddividono in tre sottogruppi: SPR1 (2 proteine), SPR2

(10 proteine) e SPR3 (1 proteina). Le SPR hanno la stessa organizzazione strutturale: hanno un dominio di testa (N-terminale) e di coda (C-terminale) in cui sono abbondanti i residui di Gln e Lys, e un dominio centrale costituito da unità variabili (2-10) di sequenze peptidiche ripetute costituite da 8 residui (SPR1, SPR3) o da 9 residui (SPR2), queste sequenze ripetute sono ricche in Prolina. In soluzione le SPR non hanno una struttura organizzata, la minima struttura presente è dovuta alle sequenze ripetute ricche in Prolina (Tarcsa et al., 1998; Candi et al., 1999; Steinert et al., 1999). In vitro le SPR sono substrato delle transglutaminasi e i residui di Glutammina e Lisina utilizzati dalle transglutaminasi sono quelli che si trovano nei domini N- e C-terminali. Il contributo delle SPR all'assemblaggio e alla funzione dell'involucro corneo potrebbe essere simile a quello descritto per la loricrina. Infatti, la disorganizzazione strutturale delle SPR potrebbe contribuire a conferire elasticità all'involucro corneo mentre i legami catalizzati dalle transglutaminasi contribuiscono a determinare la resistenza meccanica. Il contenuto relativo di loricrina e SPRs nell'epidermide può essere diverso nelle diverse aree del corpo dell'organismo e può dipendere dallo spessore dell'epidermide. Infatti, il rapporto SPR:loricrina può variare da <1:100 nell'epidermide sottile del tronco a 1:10 nell'epidermide del labbro, del palmo della mano e della pianta dei piedi, a >1:3 in quella dello stomaco anteriore dei roditori (Steinert et al., 1998). Questa variazione è alla base delle diverse proprietà di elasticità e resistenza meccanica dei diversi organi. Inoltre, nell'epidermide umana l'espressione delle SPR2 aumenta durante l'invecchiamento e dopo esposizione ai raggi ultravioletti. Da un punto di vista strutturale, il dominio centrale delle SPR è costituito da ripiegamenti beta (Steinert et al., 1999).

Profilaggrina

La profilaggrina umana è una proteina di circa 500KDa, strutturalmente complessa. E' inizialmente fosforilata ed accumulata nei granuli di cheratoialina. Durante il processo di cheratinizzazione dell'epitelio la profilaggrina viene defosforilata, processata proteoliticamente e come filaggrina monomerica viene utilizzata dalle transglutaminasi per essere parte dell'involucro corneo (Figura 4) (Resing et al., 1985; Resing et al., 1993). L'organizzazione strutturale della filaggrina consiste in una serie di sequenze tandem ripetute di circa 35KDa, separate da peptidi di 7-10 aminoacidi detti peptidi di collegamento o "linker" (Gan et al., 1990). I domini ripetuti di filaggrina sono carichi positivamente essendo ricchi di

INTRODUZIONE

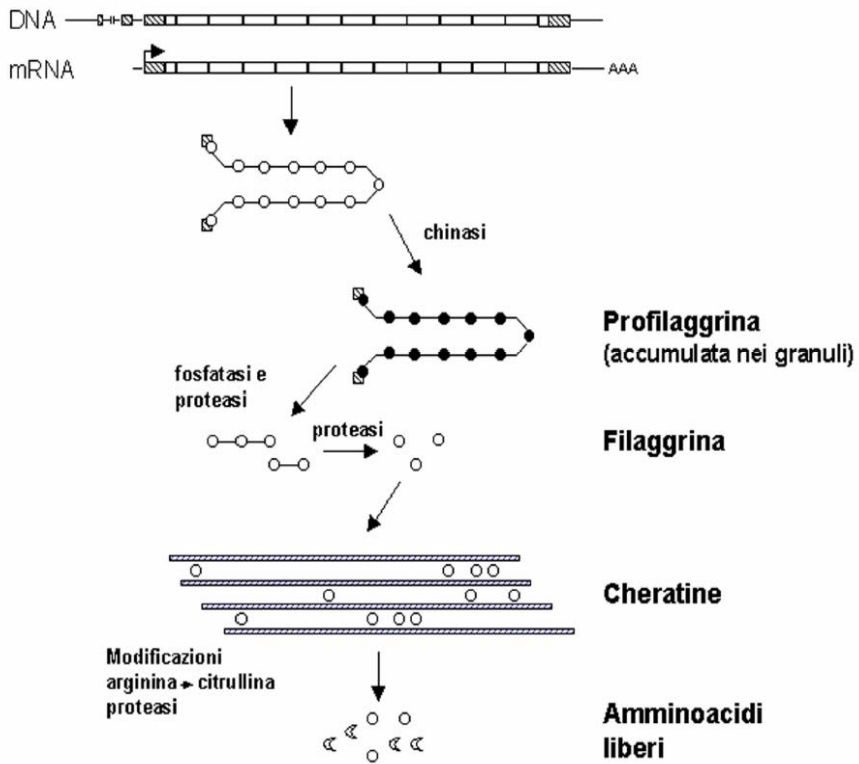


Figura 4. Sintesi della profilaggrina e modificazioni post-traduzionali. Nello schema è mostrato il processo di sintesi della profilaggrina e della filaggrina, la sua interazione con i filamenti di cheratina e la degradazione a singoli amminoacidi. Queste modificazioni avvengono nei vari strati dell'epidermide.

Arginina e Istidina, ed è stato ipotizzato che queste regioni cariche positivamente possano interagire con i residui carichi negativamente dei filamenti di cheratina (Mack et al., 1993). Inoltre i primi 80 residui aminoacidici della filaggrina contengono due "EF-hand" domini leganti il calcio tipici delle proteasi e di altre proteine leganti il calcio (Markova et al., 1993). La struttura secondaria è conservata ed è formata da porzioni ripetute di tetrapeptidi che assumono una configurazione di ripiegamento beta (Mack et al., 1993). Come ci si aspetterebbe da una proteina che funziona da "collante" per i filamenti intermedi di cheratina, la filaggrina non è una proteina strutturalmente organizzata. In vitro la filaggrina ha la proprietà unica di aggregare i filamenti intermedi di cheratina a formare delle fasciole di filamenti molto salde tra loro, in cui le molecole di cheratina sono associate in modo estremamente ordinato (Steinert et al., 1981). L'effetto dell'azione della filaggrina determinerebbe il collasso del citoscheletro del cheratinocita con conseguente modifica della morfologia della cellula che da ellissoide assume una forma piatta con i fasci di filamenti di cheratina paralleli alla superficie esterna dell'epidermide. Nell'involucro corneo, la filaggrina viene degradata interamente a livello di singoli aminoacidi, questo determinerebbe un accumulo di aminoacidi idrofobici nella cellula (fino a 100mM) essenziale per la ritenzione idrica che contribuisce alla flessibilità dell'involucro corneo.

In sostanza, tre sono le funzioni più importanti della filaggrina: (1) allinea i filamenti intermedi di cheratina, (2) controlla il cambiamento morfologico delle cellule, (3) mantiene idratata l'epidermide.

Tricoialina (THH)

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

La THH ha tre funzioni: (1) è una proteina della matrice interfilamentosa substrato delle transglutaminasi, (2) svolge un ruolo di rinforzo dell'involucro corneo; in questo caso viene legata a numerose proteine

incluse involucrina e SPR. (3) Infine coordina i legami tra i filamenti intermedi e l'involucro corneo. Quindi la THH è essenziale per la resistenza meccanica dell'involucro corneo e per il coordinamento della rete dei filamenti intermedi.

1.4.2. Il citoscheletro di cheratine

Attraverso tecniche di immunofluorescenza e di microscopia elettronica, è possibile evidenziare, all'interno della maggior parte delle cellule eucariotiche, un intricato reticolo di filamenti proteici che, in quanto responsabile della forma e dell'organizzazione interna del citoplasma, viene indicato come *citoscheletro*. Questa formazione intracellulare svolge non solo ruoli prettamente strutturali, ma è dotata di una struttura dinamica e flessibile, in grado di modificarsi in risposta alle diverse condizioni ed esigenze della cellula. Oltre a fornire un'organizzazione spaziale agli organelli e a contribuire al traffico vescicolare, il citoscheletro gioca un ruolo fondamentale anche nella mitosi e, insieme con la matrice extracellulare e le giunzioni di membrana, nel movimento della cellula, nella regolazione del ciclo vitale e nel mantenimento del suo stato di differenziamento. L'impalcatura citoscheletrica è costituita da un'intricata rete di polimeri proteici; questi possono essere distinti al microscopio elettronico in base al loro diametro in tre classi: i *microtubuli*, i *filamenti intermedi* e i *microfilamenti* con un diametro, rispettivamente, di 25, 10 e 7 nm. I microtubuli sono polimeri di tubulina, un dimero composto da una subunità di alfa- e una di beta-tubulina. I microfilamenti derivano dall'aggregazione di monomeri di actina globulare. I filamenti intermedi (*Intermediate Filaments*, IF) costituiscono un insieme numeroso ed eterogeneo di proteine fibrose accomunate da motivi strutturali e di sequenza. Studi recenti hanno evidenziato come, in realtà, questi tre tipi di filamenti proteici di per sé non siano in grado di dar luogo a un'impalcatura stabile e funzionale; in effetti, la complessa architettura del citoscheletro sembrerebbe dipendere da numerose proteine accessorie che collegano i filamenti tra loro e ad altre strutture della cellula (Tanaka et al., 1991; Stappenbeck et al., 1993). Nell'uomo sono stati identificati più di 50 differenti geni codificanti per le proteine degli IF, che sono espressi differenzialmente in quasi tutte le cellule del corpo. Gli IF generalmente costituiscono l'1% circa delle proteine totali, sebbene in alcune cellule, come i cheratinociti e i neuroni, possano ammontare fino all'85% delle proteine

delle cellule completamente differenziate. Cellule differenti esprimono set differenti di IF, cosicché ciascun tipo cellulare presenta il proprio citoscheletro di IF fatto su misura per assolvere alle sue specifiche necessità strutturali (Fuchs e Weber, 1994). In base al grado di omologia dei domini centrali delle loro proteine componenti, gli IF sono stati suddivisi in cinque tipi principali: IF di tipo I o cheratine acide ($4.5 < pI < 5.5$); IF di tipo II o cheratine basiche ($6.5 < pI < 8$); proteine IF di tipo III vimentina-simili; proteine IF di tipo IV o proteine dei neurofilamenti e proteine IF di tipo V o lamine. Gli IF espressi specificatamente nei tessuti epiteliali sono i filamenti intermedi di cheratina (Keratin Intermediate Filaments, KIF), i quali sono eterodimeri obbligati di catene proteiche cheratiniche (Steinert et al., 1988; Albers and Fuchs, 1992). Le cheratine sono costituite da una regione centrale di 310 amminoacidi ad α -elica, altamente conservata in sequenza e lunghezza, che presenta brevi interruzioni, detti linkers non elica. I domini carbossi- e ammino-terminali non hanno una struttura ad α -elica e differiscono nella dimensione e sequenza fra le diverse cheratine. Il dominio centrale è responsabile dell'assemblamento dei filamenti stessi e dell'interazione con le proteine associate ai filamenti. Le cheratine hanno un peso molecolare compreso tra 40 e 67 kDa; in base al punto isoelettrico vengono distinte in cheratine di tipo I (o acide) e di tipo II (basiche). Gli eterodimeri che costituiscono l'unità fondamentale dei KIF, detta protofilamento, sono formati da una cheratina di tipo I ed una di tipo II. Negli epitelii umani sono state identificati 19 tipi diversi di cheratine, contraddistinte da un numero progressivo da 1 a 19 secondo il catalogo di Moll (Moll et al., 1982); fino ad oggi nell'epidermide ne sono state riscontrate 8. Durante il suo processo di maturazione il cheratinocita sintetizza coppie diverse di cheratine, le cheratine K5 e K14 (58 e 50 kDa rispettivamente) nello strato basale e le coppie K1/K10, K1/K11 e K2/K10, K2/K11 (pesi molecolari compresi tra 56.5 e 67 kDa) negli strati soprabasali (Figura 5). Inoltre, alcuni geni come quelli codificanti per le cheratine K6 e K16 sono attivati nelle regioni iperproliferative dell'epidermide (punta del piede e palmo della mano) (Saurat et al., 1990). La quantità di cheratine aumenta procedendo attraverso i diversi strati dell'epidermide dall'interno verso l'esterno; nello strato basale le cheratine costituiscono il 30% delle proteine totali e, dopo essersi associate ai granuli di cheratoialina nello strato granuloso, arrivano a costituire l'85% in quello corneo (Saurat et al., 1990). I KIF formano una tipica struttura a raggiera anastomizzata (Fig.4) che, dalla regione paranucleare della cellula, si estende fino alla membrana plasmatica, dove entra in relazione con giunzioni specializzate, desmosomi ed

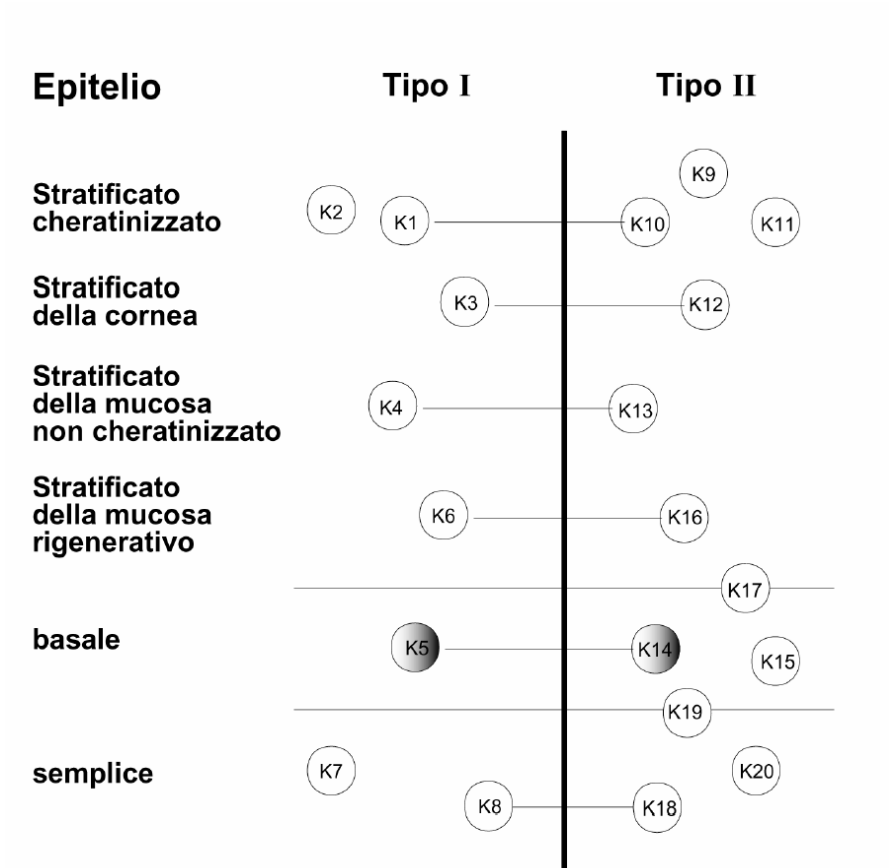


Figura 5. Appaiamento specifico delle cheratine. Rappresentazione schematica dell'appaiamento delle cheratine di tipo I e II nei diversi epitelii umani. Le K5 e le K14, specifiche dello strato basale dell'epidermide umana, sono indicate dal cerchio ombreggiato.

emidesmosomi, e quindi si connette con le reti citoscheletriche delle cellule adiacenti. Le proprietà meccaniche della pelle vengono assicurate da questa complessa ed elaborata rete citoscheletrica estesa attraverso i desmosomi a tutte le cellule del tessuto (Jones and Green, 1991). A dispetto di quanto si pensasse un tempo, i KIF, come altri tipi di IF, presentano strutture altamente dinamiche. Esperimenti di microiniezione di RNA epidermici (Franke et al., 1984) o di peptidi estranei (Vikstrom et al., 1989), e l'espressione transitoria di cheratine troncate con conseguente disassemblaggio della rete di filamenti intermedi (Albers and Fuchs, 1987), mettono in luce un continuo scambio di subunità fra filamento cheratinico e citoplasma. Questi dati, insieme ad altri più recenti, mostrano che nelle cellule viventi le proteine IF sono continuamente scambiate lungo l'intera lunghezza del filamento, sia in risposta a manipolazioni sperimentali che a stadi del ciclo cellulare, della mitosi e del differenziamento (Jones et al., 1982; Goldman and Steinert, 1990). Questo comportamento dinamico è un processo ciclico che implica l'attività di specifiche chinasi e fosfatasi che promuovono, rispettivamente, il disassemblaggio e il riassetto degli IF (Stewart, 1990). Nel caso dei cheratinociti, cellule particolarmente soggette a stress meccanici, il citoscheletro deve assicurare un'impalcatura intracellulare abbastanza robusta ma anche molto flessibile. La struttura degli IF è particolarmente adatta a questa funzione meccanica: dal momento che le subunità fibrose costituenti gli IF si associano fianco a fianco in file sovrapposte, le loro fibre possono sopportare forze di stiramento molto maggiori dei microtubuli o dei filamenti di actina. Nell'epidermide, così come in tutti i tessuti epiteliali, sono le cellule, anziché la matrice extracellulare, peraltro scarsa, a sopportare la maggior parte delle sollecitazioni meccaniche, mediante la robusta intelaiatura citoscheletrica. Allo scopo di trasmettere gli stress meccanici tra cellule adiacenti, i KIF, e gli altri componenti del citoscheletro, sono legati a proteine che attraversano la membrana plasmatica, dove si formano giunzioni specializzate tra le superfici di cellule adiacenti o tra le cellule e la sottostante membrana basale (Green and Jones, 1996). Le giunzioni di ancoraggio, desmosomi, emidesmosomi e giunzioni aderenti, sono particolarmente adatte a questa funzione di collegamento e, pertanto, sono molto rappresentate nei tessuti epiteliali. Desmosomi ed emidesmosomi, mediando la connessione degli elementi del citoscheletro di una cellula con quelli di un'altra, o con la matrice extracellulare, consentono ai cheratinociti dei diversi strati dell'epidermide di funzionare come una solida unità strutturale, in grado di

reggere anche notevoli tensioni (Stappenbeck et al., 1994; Kowalczyk et al., 1994).

Proteine Associate ai Filamenti Intermedi

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

1.4.3 I lipidi sintetizzati nei cheratinociti e la componente lipidica dell'involucro corneo

La componente più esterna dell'involucro corneo è costituita dai lipidi. I lipidi sintetizzati dall'epidermide svolgono la funzione di barriera e limitano la perdita di liquidi. La maggior parte dei lipidi è costituita dai ceramidi, colesterolo, acidi grassi, ed esteri del colesterolo che formano lamelle tra i corneociti dello strato corneo dell'epidermide. Questi lipidi sono sintetizzati dai cheratinociti, vengono accumulati in granuli detti granuli lamellari o corpi di Odland, che nella parte superiore dello strato granuloso si fondono con la membrana plasmatica e riversano il loro contenuto nello spazio extracellulare (Bouwstra et al., 2003; Madison et al., 2003). Dopo l'estruzione dei lipidi nell'ambiente extracellulare, avvengono numerose modifiche ad opera di un gruppo di idrolasi acide che si trovano anch'esse nello spazio extracellulare (Freinkel et al., 1985; Grayson et al., 1985; Menon et al., 1992). Tra gli enzimi coinvolti nella trasformazione dei lipidi extracellulari, troviamo: la beta-gluco-cerebrosidasi, la sfingomielinasi acida e la fosfolipasi A2 (Holleran et al., 1994; Jensen et al., 1999; Schumuth et al., 2000). Sono stati descritti diversi modelli animali che mostrano che la funzione di barriera dell'epidermide è compromessa se alcune vie

metaboliche di sintesi o degradazione dei lipidici vengono alterate (Attar et al., 1997; Stone et al., 2000). Studi eseguiti al microscopio elettronico hanno dimostrato che i lipidi sono organizzati in membrane impilate le une sulle altre che riempiono lo spazio extracellulare (Elias et al., 1975), mentre esperimenti di biofisica hanno evidenziato che nelle lamelle extracellulari i lipidi possono presentarsi in fase di gel o in fase liquida (Forslind et al., 1994). Un aspetto importante e non completamente risolto riguarda il meccanismo molecolare attraverso il quale i lipidi delle lamelle interagiscono con le proteine dell'involucro corneo. Gli idrossiceramidi a catena lunga sono presenti sulla superficie extracellulare dell'involucro corneo, alcuni di questi potrebbero essere legati covalentemente attraverso legami estere alla superficie esterna dell'involucro corneo (Goldstein et al., 2003). A conferma di tale ipotesi, la TGasi 1 può catalizzare la reazione di esterificazione di una idrossiceramide a catena lunga con alcuni residui aminoacidici dell'involucrina (Nemes et al., 1999; Kalinin et al., 2002). Tuttavia è possibile che altre proteine possano essere legate in modo covalente con i lipidi, infatti il topo knockout per l'involucrina non ha alcuna anomalia nei lipidi dell'involucro corneo (Djian et al., 2000).

1.5 Assemblaggio dell'involucro corneo

Si ritiene che l'assemblaggio del CE proceda essenzialmente attraverso 3 stadi principali a cominciare dagli ultimi livelli dello strato spinoso: iniziazione, formazione dell'involucro lipidico e consolidamento (Figura 6).

1.5.1. Iniziazione

Come conseguenza dell'aumento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule soprabasali vengono espresse tre proteine strutturali: invoplachina, periplachina e involucrina. Invoplachina e periplachina formano eterotetrameri stabili ed è stato dimostrato *in vitro* che sono in grado di interagire con l'involucrina per associarsi in maniera Ca^{2+} -dipendente alla membrana plasmatica. Contemporaneamente, viene espressa e attivata la TGasi1. Questo enzima, localizzato nella membrana grazie ad ancore lipidiche, risponde agli aumentati livelli di Ca^{2+} unendo le plachine e l'involucrina attraverso legami crociati N- ϵ -(γ -glutammi)lisina. Lo stesso enzima media anche l'unione di altre proteine associate alla membrana e ai

INTRODUZIONE

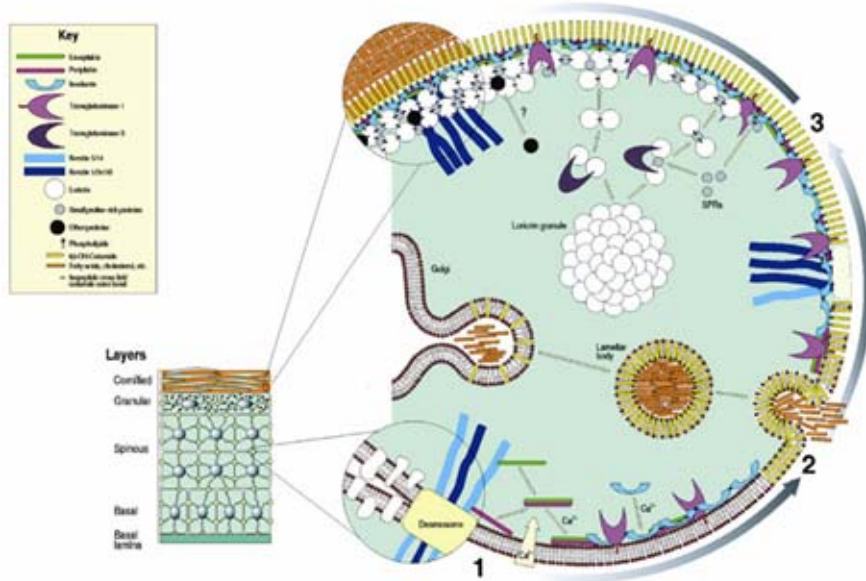


Figura 6. Modello di formazione dell'involucro corneo nell'epidermide

desmosomi, modificando in tal modo drasticamente le proprietà dinamiche delle giunzioni cellulari e del citoscheletro (Figura 7). Gradualmente, l'aggregazione involucrina-involochinaperiplachina forma uno strato supermolecolare depositato appena sotto la superficie interna della membrana plasmatica. La formazione di questa impalcatura proteica, o *scaffold*, è comune all'assemblaggio del CE di altri epitelii squamosi pluristratificati. Comunque, l'assemblaggio nelle cellule epidermiche differisce nei 2 seguenti passaggi.

1.5.2 Formazione dell'involucro lipidico

Nello strato granuloso, i cheratinociti producono ed accumulano i corpi lamellari. Come detto in precedenza, in queste vescicole secretorie vengono accumulate ω -idrossicerammidi con catene aciliche particolarmente lunghe ($> C30$). La secrezione dei corpi lamellari si attua all'interfaccia tra lo strato granuloso e quello corneo. Questo processo arricchisce la membrana plasmatica di ω -idrossicerammidi le cui catene aciliche sono lunghe abbastanza da attraversare il doppio strato lipidico in modo da esporre il loro gruppo ω -OH nel citosol. Esperimenti *in vitro* (Marekov e Steinert, 1998) hanno evidenziato che la TGasi 1 ancorata alla membrana plasmatica può esterificare covalentemente queste cerammidi con residui di Gln delle proteine dello scaffold (Fig. 7). Sembrerebbe che questi lipidi ad uno stadio successivo sostituiscano il normale doppio strato fosfolipidico e intervengano nell'organizzazione spaziale e strutturale degli altri lipidi extracellulari.

1.5.3 Consolidamento

Nelle fasi finali del suo processo di formazione, il CE viene rafforzato mediante l'incorporazione del suo principale costituente proteico, la loricrina (Fig.7). La loricrina è una proteina scarsamente solubile e, a questo stadio di differenziamento del cheratinocita, si trova nel citosol a formare granuli insolubili. Si ritiene che lo spostamento della loricrina verso la periferia della cellula possa avvenire tramite una sua parziale solubilizzazione. Esperimento condotti *in vitro* suggeriscono che la TGasi 3 citosolica possa mediare questa solubilizzazione legando covalentemente catene di loricrina con molecole altamente solubili come le SPR. Gli oligomeri così formati sono traslocati in

INTRODUZIONE

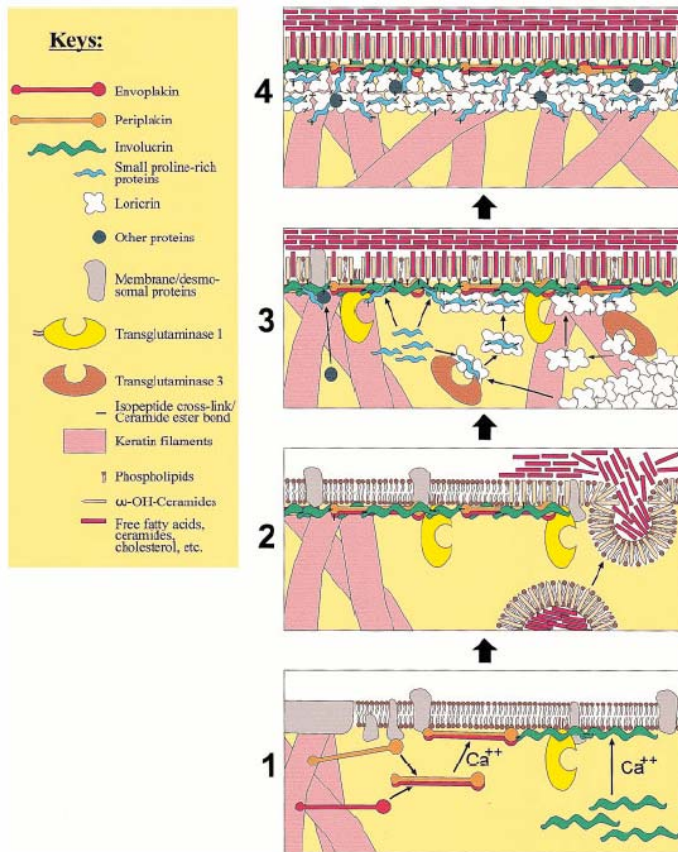


Figura 7. Modello dell'assemblamento dell'involucro corneo. Il primo passaggio è l'iniziazione, che ha luogo nello strato spinoso, e che coinvolge la sintesi di proteine strutturali dell'involucro corneo e l'estrusione di specifici lipidi nello spazio intercellulare. La seconda fase è quella di consolidamento, che avviene nello strato granuloso e comporta il legame covalente tra lipidi e proteine dell'involucro corneo, e il legame covalente tra loricrina e SPRs determinati dall'attività della TG3 e della TG1. Infine, nella fase di desquamazione, che avviene nello strato corneo, l'attività della TG1 permette il legame tra loricrina e altre proteine dell'involucro con l'estrusione di ceramidi, acidi grassi e colesterolo.

periferia dove si ritiene che la TGasi 1 li associ con lo scaffold proteico preesistente. Sempre durante la fase di consolidamento del CE vengono aggiunte all'impalcatura proteica le altre componenti del CE: la cistatina α l'elafina e tutte le altre proteine dello stato differenziativo terminale del cheratinocita. Sembra, in particolare, che i KIF, ora costituiti interamente dalle cheratine K1, K2 e K10, siano legati covalentemente al CE tramite le desmoplachine in corrispondenza delle preesistenti giunzioni aderenti e desmosomiali. Alla fine di questa lunga serie di eventi, il corneocita maturo si trasforma nella lamella cornea in cui grandi fasci di KIF sono covalentemente saldati al CE; questa struttura resistente ma flessibile circondata da una matrice lipidica altamente organizzata è alla base delle proprietà meccaniche e di impermeabilità necessarie per la sopravvivenza dei mammiferi nell'ambiente terrestre.

1.6 Ruolo delle proteasi e dei loro inibitori nell' epidermide

Le proteasi sono state a lungo considerate responsabili della degradazione intralisosomiale delle proteine, è noto invece che la regolazione dell'attività degli enzimi proteolitici è essenziale anche nell'omeostasi delle cellule e dei tessuti. Studi effettuati negli ultimi anni hanno dimostrato che le *cathepsine*, proteasi a cisteina lisosomiali, sono coinvolte in una moltitudine di processi fisiologici, come attivazione di proenzimi, attivazione di enzimi, presentazione di antigeni, maturazione di ormoni, modellamento tissutale, e riassorbimento della matrice ossea (Dickinson, 2002). Studi recenti hanno rivelato che la cathepsina agisce come mediatore della morte cellulare programmata, ed hanno dimostrato l'esistenza di una via apoptotica nei lisosomi cathepsina-dipendente (Foghsgaard et al., 2001; Stoka et al., 2001; Turk et al., 2002). La sua implicazione in molteplici processi vitali e patologie la rendono interessante come bersaglio nella realizzazione di farmaci. La regolazione dell'attività delle proteasi a cisteina è regolata da diversi fattori, tra cui i più importanti sono gli inibitori di proteasi. L'importanza della regolazione proteolitica negli epitelii è stata ben dimostrata dalla scoperta dell'inibitore della proteasi a serina SPINK5, come gene difettivo nella sindrome di Netherton (Chavanas et al., 2000), mutazioni della cathepsina C nella sindrome di Papillon-Lefevre (Toomes et al., 1999), e mancanza di Cathepsina L nei topi *furless* (Roth et al., 2000). Possiamo quindi ipotizzare che nel caso delle transglutaminasi, enzimi sottoposti ad attivazioni proteolitiche, le proteasi devono avere un ruolo

INTRODUZIONE

importante nella regolazione della loro attività per controllare specificatamente la formazione dell'involucro corneo e la struttura epidermica.

1.7 Le transglutaminasi

Le *transglutaminasi* (TGasi; EC 2.3.2.13) rappresentano una famiglia di enzimi funzionalmente e strutturalmente correlati che catalizzano la reazione di trasferimento acilico Ca^{2+} -dipendente tra il gruppo γ -carbossiamidico di residui di glutammina e il gruppo amminico di varie ammine primarie. Il risultato della reazione è una modificazione post-traduzionale, ed in molti casi si ha l'oligomerizzazione delle proteine substrato in seguito alla sintesi di legami ϵ -(γ -glutamyl)lisina. Il termine transglutaminasi fu introdotto per la prima volta da Clarke et al. (1957), per descrivere l'attività transamidante osservata nel fegato del porcellino d'India. Studi successivi (Pisano et al., 1968) sulla stabilizzazione dei monomeri di fibrina durante la formazione del coagulo dimostrarono che la transamidazione era effettuata da enzimi che legavano le proteine attraverso la formazione di un legame isopeptidico ϵ -(γ -glutamyl)lisina. In comune con altre funzioni trovate nelle cellule di mammifero, le TGasi richiedono il legame con il Ca^{2+} per la loro attività, ma a concentrazioni normalmente sovralfisiologiche (Burgoyne et al., 2001). Inoltre la loro attivazione da Ca^{2+} è modulata da ulteriori processi regolatori, e quindi sono virtualmente inattive in condizioni normali, mentre sono attivate solo all'uscita dal normale meccanismo fisiologico. Una volta attivate, le TGasi possono catalizzare una serie di reazioni differenti, che vanno anche al di fuori della generica transamidazione, e che risultano in una modificazione post-traduzionale covalente (Figura 8). Fra queste reazioni, interessante è stata la scoperta della funzione di *transesterificazione* della TGasi 1, associata con il differenziamento terminale dei cheratinociti (Nemes et al., 1999). Importante è anche il significato biologico della *deamminazione* e dell'*incorporazione di ammine*. La deamminazione comporta la sostituzione di un residuo neutro di glutammina con uno carico negativamente di glutammato, con un cambiamento dell'equilibrio che governa la solubilità, la conformazione, la stabilità, l'associazione oligomerica e l'interazione con un ligando della proteina target. Ciò è stato dimostrato per la gliadina A, che viene deamminata dalla TGasi 2, preferenzialmente nella sequenza Gln-X-Pro. In questo caso, la proteina deamminata attiva i linfociti T nella malattia autoimmune detta morbo celiaco (Shan et al., 2002). Lo stesso ragionamento potrebbe essere applicato per la poliamminazione, che porta la sostituzione della catena laterale neutra della glutammina con una caricata positivamente dalle poliammine. Quando

INTRODUZIONE

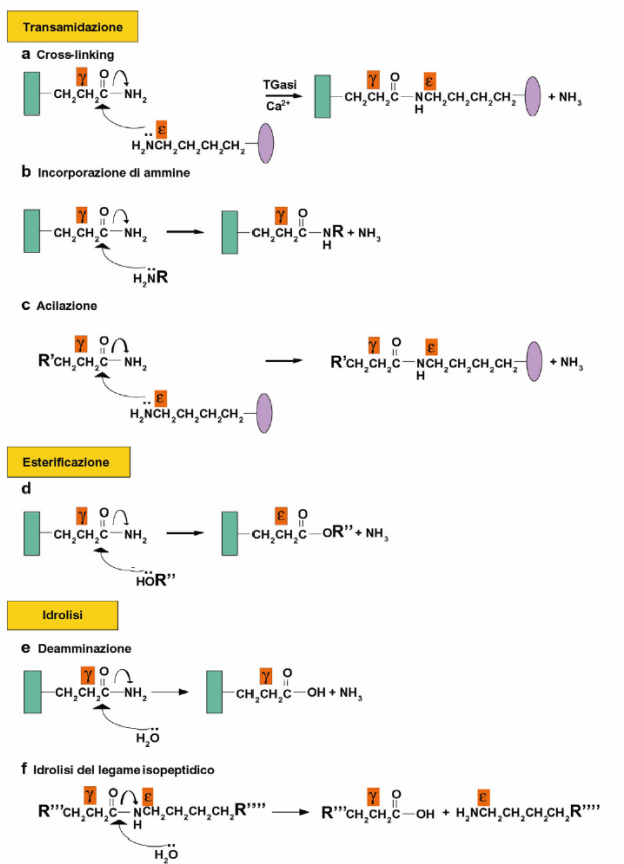


Figura 8. *Reazioni post-traduzionali catalizzate dalle transglutaminasi.* La transamidazione può causare (a) il legame crociato fra proteine mediante la formazione di un legame isopeptidico ϵ (γ - glutamil) lisina fra una lisina deprotonata di una proteina (ellisse viola) ed una glutammica di un'altra proteina (rettangolo verde); (b) l'incorporazione di un'ammina (H_2NR) in un residuo di glutammica della proteina accettrice; (c) l'acilazione della catena laterale di lisina di una proteina donatrice. Le reazioni b e c competono con il legame crociato mostrato in a. Le altre reazioni catalizzate dalle TGasi sono (d) l'esterificazione, (e) la deaminazione e (f) l'idrolisi del legame isopeptidico. Sono mostrati i movimenti degli elettroni (freccie curve) nelle reazioni nucleofile in assenza di enzima. R rappresenta la catena laterale di un'ammina primaria; R', un peptide contenente una glutammica; R'', una ceramide; R''' e R''', le catene laterali in isopeptidi ramificati.

INTRODUZIONE

la reazione di trasferimento acilico riguarda un gruppo γ -carbossiammidico di glutammina ed un gruppo ε -amminico di lisina, il risultato è la formazione di un *legame isopeptidico ε -(γ -glutamil)lisina* (Lorand & Conrad, 1984). In questo modo, le TGasi catalizzano la formazione di legami crociati (*cross-linking*) fra proteine sia intramolecolari che intermolecolari, promuovendo la formazione di macromolecole ad alto peso molecolare, stabili e altamente insolubili. La polimerizzazione dei precursori proteici conferisce infatti un'elevata resistenza alla rottura meccanica e all'attacco di agenti chimici ai polipeptidi coinvolti nel legame ed i polimeri possono essere distrutti soltanto mediante degradazione proteolitica delle catene proteiche. Proteasi in grado di idrolizzare i legami crociati formati dalle TGasi sono state descritte solamente nella saliva della sanguisuga (Zavalova et al., 1996). Nell'uomo sono stati finora caratterizzati nove membri della famiglia delle transglutaminasi, TGasi 1-7, fXIIIa e banda 4.2, ognuno dei quali è coinvolto in differenti processi biologici, quali la stabilizzazione degli aggregati di fibrina, la coagulazione del liquido spermatico, l'endocitosi, l'apoptosi, la formazione dell'involucro corneo e il consolidamento delle strutture della matrice extracellulare. Dei membri della famiglia delle TGasi, elencati nella Tabella 3, almeno quattro sono espressi e sintetizzati nell'epidermide umana: la TGasi1 o TGasi cheratinocitica, un enzima associato alla membrana con un peso molecolare di 106 kDa (Thacher et Rice, 1985; Kim et al., 1991); la TGasi2 o TGasi tissutale, enzima solubile ed ubiquitario di 77 kDa (Lichti et al., 1985); la TGasi3 o TGasi epidermica, un pro-enzima solubile di 80 kDa (Ogawa e Goldsmith, 1976; Park et al., 1988) e la TGasi 5, o TGasi X, un enzima ubiquitario di recente caratterizzazione (Aeschlimann et al., 1998, Candi et al., 2001). Le altre TGasi comprendono: il fattore XIIIa (fXIIIa) della coagulazione, presente nel sangue come zimogeno ed attivato proteoliticamente dalla trombina, responsabile della retrazione del coagulo (Ichinose et al., 1988); la TGasi 4, o TGasi prostatica, responsabile della coagulazione del seme (Grant et al., 1994); la banda 4.2, un'enzima inattivo localizzato nella membrana degli eritrociti, dove svolge funzioni strutturali (Korsgren e Cohen, 1986; Korsgren e Cohen, 1988). Infine, due nuovi geni *TGM6* e *TGM7* sono stati recentemente identificati nel genoma umano (Grenard et al., 2001) e i loro rispettivi prodotti genici, TGasi 6 e TGasi 7, attendono ancora una completa caratterizzazione.

INTRODUZIONE

Proteina	Sinonimo	Residui (Mr, Kda)	Espressione tissutale*	Localizzazione	Funzione	Gene	Locus Genetico	Malattie Collegate
FXIII [†] subunit A (fXIIIa)	Fattore stabilizzante la fibrina, Fattore Laki-Lorand, Pro-fibrinolisasi, Plasma pro-TG	732(83)	Piastrine, astrociti, cellule Dentritiche dermali, Condrociti, placenta, Plasma, fluido sinoviale	Citosolica, extracellulare	Coagulazione del sangue, crescita delle ossa	F13A1	6p24-25	Mancanza di fXIII
TG1 [‡]	TG _K , TG cheratinocitica, particulate TG	814(90)	Cheratinociti, cervello	Membrana, citosolica	Formazione dell'involucro corneo cellulare	TGM1	14q11.2	Ittiosi lamellare
TG2 [‡]	TG _C , TG tissutale, TG endoteliale, TG eritrocitica, Gh, Gha	686(80)	Ubiquitaria	Citosolica, nucleare, membrana, superficie cellulare, extracellulare	Varie	TGM2	20q11-12	Sconosciute
TG3 [‡]	TG _E , TG epidermica, TG del callo, TG del follicolo pilifero	692(77)	Epiteli squamosi, cervello	Citosolica	Formazione dell'involucro corneo cellulare	TGM3	20q11-12	Sconosciute
TG4 [‡]	TG _P , TG prostatica, vesicolasi, proteina dorsale prostatica 1(DP1), proteina principale secretoria prostatica regolata da androgeni	683(77)	Prostata	Sconosciuta	Coagulazione dello sperma nei roditori	TGM4	3q21-22	Sconosciute
TG5 [‡]	TG _K	719(81)	Ubiquitaria eccetto per il CNS e il sistema linfatico	Sconosciuta	Formazione dell'involucro corneo cellulare	TGM5	15q15.2	Sconosciute
TG6 [‡]	TG _C	Sconosciuto	Sconosciuta	Sconosciuta	Sconosciuta	TGM6	20q11	Sconosciute
TG7 [‡]	TG _Z	710(?)	Ubiquitaria	Sconosciuta	Sconosciuta	TGM7	15q15.2	Sconosciute
Banda 4.2 [¶]	B4.2, proteina eritrocitica di membrana della banda 4.2 che lega l'ATP	690(72)	Globuli rossi, midollo osseo, fegato fetale, milza	Membrana	Componente dello scheletro di membrana	EPB42	15q15.2	Sferocitosi ereditaria

Sono indicati solo tessuti ad alto livello di espressione. †Attivato dalla trombina- la trombina più il Ca²⁺ - la specie attivata è della fXIIIa o A₂- è la subunità A che possiede la potenzialità catalitica sia nel fXIII delle piastrine (un omodomero A₂) che nel fXIII plasmatici (un etrodimero A₂B₂). §Sebbene sia convenzionale usare le lettere per descrivere i membri di una famiglia di proteine, come TG_{XYZ}, qui viene usata la designazione numerica perché le lettere usate per i membri di questa famiglia caratterizzati inizialmente non sono state assegnate in ordine alfabetico, ma riferite alla loro espressione tissutale o cellulare predominante. ¶Proteoliticamente attivato. ¶¶Manca di attività transglutaminasica. TG, transglutaminasi.

1.7.1 Meccanismo catalitico

A tutt'oggi non è stata ancora eseguita un'analisi dettagliata del meccanismo catalitico di questa classe di enzimi. La maggior parte degli studi enzimatici si è concentrata sul fattore XIIIa (Hettasch et al., 1997; Micanovic et al., 1994) e sulla TGasi 2 (Folk e Finlayson, 1977). Da questi studi è emerso che la reazione a due substrati catalizzata da questi enzimi segue il meccanismo a doppio spostamento (ping pong) con uno schema modificato, che comprende l'azione dell'acqua (Figura 9); Folk e Finlayson, 1977). Il primo substrato a legarsi all'enzima è quello contenente il residuo di Gln (conosciuto come substrato "donatore" o "Q"). Dopo la formazione del complesso binario enzima-substrato, si ha la fase di acilazione in cui la cisteina del sito attivo si lega, tramite un legame tioestere, al gruppo α -carbonilico della Gln substrato, formando un intermedio acil-tioestere legato all'enzima, chiamato *intermedio acil-enzima* (Folk, 1969). Dopo il rilascio di ammoniaca (primo prodotto), l'enzima si associa al secondo substrato, un residuo di Lys di una proteina (noto come substrato "accettore" o "K" nel caso della reazione di transamidazione) o una poliammina. La deacilazione si verifica attraverso amminolisi dell'intermedio acil-tioestere, portando alla rigenerazione dell'enzima libero. L'accettore di acile durante questo processo è tipicamente l' ϵ -ammino gruppo di un residuo di lisina o il gruppo amminico primario di poliammine fisiologiche (come la spermidina e la putrescina). In assenza di un'ammina primaria, l'acqua è in grado di rigenerare l'enzima libero, sebbene con una cinetica molto più lenta. Inoltre, *in vitro*, le transglutaminasi hanno anche mostrato di aver attività su certi esteri ad alta energia, catalizzando la loro idrolisi o amminolisi (Folk et al., 1969). Si pensa che il passaggio limitante di queste reazioni sia la formazione del complesso intermedio acil-enzima. Le diverse forme isoenzimatiche condividono un comune meccanismo d'azione. L'attività catalitica è molto probabilmente mediata da una triade amminoacidica Cys-His-Asp che ricorda da vicino quella delle proteasi a cisteina papaina-simili (Cys25-His159-Asn175; Drenth et al., 1968) ed è conservata in tutte le TGasi cataliticamente attive. Questa triade è stata recentemente identificata attraverso analisi cristallografica ai raggi X nel fattore XIIIa (Cys314, His373 e Asp396; Yee et al., 1996). Il probabile meccanismo catalitico delle TGasi è illustrato schematicamente nella figura 10. Si ritiene che a pH neutro il residuo di His sia prevalentemente protonato nella forma ad ione imidazolico, probabilmente stabilizzato dalla carica negativa del residuo di

INTRODUZIONE

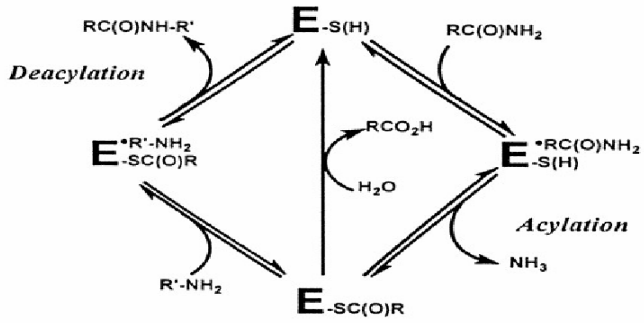


Figura 9. Schema del meccanismo di catalisi delle transglutaminasi. Lo schema è quello di un modello a doppio spostamento ordinato, modificato per l'eventuale intervento dell'acqua.

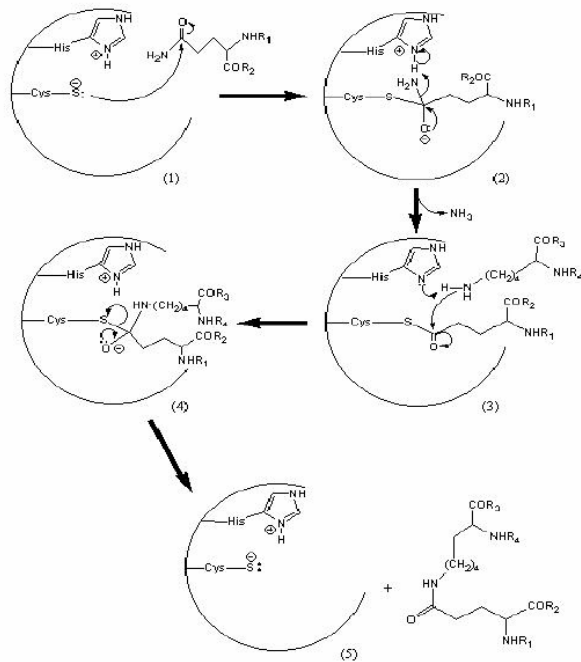


Figura 10. Ipotetico meccanismo catalitico delle transglutaminasi (dettagli nel testo).

Asp. Questo particolare intorno chimico, già descritto nel caso della papaina (Polgár, 1974; Polgár, 1979) renderebbe il residuo di Cys più acido del normale, favorendo la sua forma ad anione tiolato che è notevolmente più reattiva come nucleofilo del gruppo sulfidrilico. Il meccanismo catalitico comporterebbe pertanto la presenza di una coppia ionica imidazolio-tiolato (Fig.10, (1)). Secondo questo modello, la Cys del sito attivo, nella forma ad anione tiolato, attacca il carbonio del gruppo γ -carbonilico della Gln del primo substrato formando un intermedio tetraedrico in cui il substrato è unito covalentemente all'enzima (Fig.10, (1)). Successivamente, nello stadio lento della reazione, l'intermedio tetraedrico si scinde e lo ione imidazolio della His, che in questa fase agisce da catalizzatore acido generale, dona un H⁺ all'azoto amminico dell'intermedio determinandone il rilascio sotto forma di ammoniaca (Fig.10, (2)) Sembra che questa reazione, energeticamente sfavorita, sia parzialmente sostenuta dal rilascio di ammoniaca e dalla sua susseguente protonazione in ambiente neutro (Aeschlimann and Paulsson, 1994). La fase di acilazione produce così un intermedio tioacil-enzima (Fig.10 (2, 3)). A questo punto della reazione, l'His si comporta da catalizzatore basico generale favorendo l'attacco nucleofilo dell'azoto amminico della Lys del secondo substrato con la formazione di un secondo intermedio tetraedrico che rapidamente riarrangia (deacilazione) liberando il secondo prodotto e rigenerando così l'enzima (Fig.10, (4,5)). Per quanto riguarda la specificità di reazione, si può dire che questa sia abbastanza ristretta per quanto concerne il riconoscimento del primo substrato e meno per quello del secondo. Infatti, sebbene le TGasi utilizzino un residuo di glutamina legato ad un peptide come donatore acilico, la suscettibilità di questi residui all'attacco enzimatico dipende dalla sequenza aminoacidica dei residui che circondano la glutamina stessa (distribuzione della carica). Tipicamente, le transglutaminasi riconoscono la sequenza generica Gln-Gln*-Val, dove Gln* rappresenta il residuo donatore del gruppo acilico. Comunque, sembra che tale specificità sia distinta per ciascun isoenzima. In contrasto con la loro elevata selettività per il donatore acilico, le TGasi mostrano un'ampia tolleranza per il substrato accettore che, come già ricordato, può essere un residuo di lisina o una qualunque delle poliammine fisiologiche. Come detto prima, le TGasi richiedono Ca²⁺ per smascherare la cisteina del sito attivo ed essere così attive. Quindi il legame del calcio provoca una evidente riorganizzazione della struttura delle proteine. La recente risoluzione cristallografica della TGasi 3 attivata ha dimostrato che il legame del calcio provoca un sostanziale cambiamento conformazionale che coinvolge l'apertura di un canale nella proteina esponendo i residui chiave

che controllano l'accesso del substrato al sito di legame. Tramite l'incremento del calcio intracellulare, probabilmente la cellula può attivare le TGasi in assenza di sintesi proteica. Il Ca^{2+} è usato probabilmente come secondo messaggero anche quando l'attivazione delle TGasi è mediata da diversi agonisti, come lo sperma (nella fertilizzazione delle uova di riccio di mare, Cariello et al., 1984), il fattore di crescita epidermico (EGF, nelle cellule epidermoidi di carcinoma umano A431, Dadabay e Pike, 1987) e la trombina (che agisce sulle piastrine umane, Lorand et al., 1987). Il calcio potrebbe essere rilasciato nel citoplasma dai depositi intracellulari o potrebbe essere portato dentro la cellula dall'esterno. Data la concentrazione relativamente alta di calcio richiesta per attivare le TGasi, si può supporre che tale attivazione si ha soprattutto in situazioni estreme, quando la capacità d'immagazzinamento interno del calcio diviene sovraccaricata, o quando le pompe che espellono il calcio non riescono a bilanciare l'influsso del catione. Una caratteristica interessante delle TGasi è la loro bassa velocità di reazione. Quando si misura l'attività specifica, usando un substrato artificiale come la caseina metilata o un substrato specifico come la loricrina, la più alta velocità di reazione misurata con gli enzimi attivati delle TGasi 1 e 3 è di circa 1000 pmole di putrescina incorporata/ora/pmole di enzima, che corrisponde ad un ciclo di reazione ogni 3-4 secondi (Kim et al., 1994; Candi et al., 1998). Anche la TGasi 2 è ugualmente lenta (Kim et al., 1994). Comunque, le caratteristiche strutturali che determinano la specificità di substrato e questo modesto tasso di reazione rimangono ancora sconosciuti. Inoltre, le strutture finora risolte delle TGasi hanno rivelato la presenza di tre legami peptidici atipici in *cis*, localizzati nel dominio catalitico in motivi che fiancheggiano i residui della triade catalitica. Normalmente, questi legami sono energeticamente sfavorevoli, e si pensa che siano presenti in queste proteine perché in qualche modo sono necessari per alcuni aspetti del meccanismo di reazione oppure per conferire stabilità particolari (Weiss et al., 1998a; Weiss et al., 1998b).

1.7.2. Struttura, organizzazione genomica ed evoluzione delle TGasi

La famiglia delle transglutaminasi appartiene alla superfamiglia delle proteasi a cisteina, che include anche le proteasi papaina e calpaina, enzimi deubiquitinanti e N-acetil transferasi (Murzin et al., 1995). Tutti questi enzimi hanno in comune una triade catalitica Cys-His-Asp o Cys-His-Asn. Come detto, nel genoma umano sono stati identificati nove differenti geni

delle TGasi, di cui otto codificano per potenziali enzimi capaci di formare legami crociati regolati dal calcio (anche se non è stata ancora dimostrata l'attività catalitica delle TGasi 6 e 7), ed uno codifica per un omologo cataliticamente inattivo, la banda 4.2 degli eritrociti. Sono stati identificati ortologhi delle diverse TGasi umane in vari organismi, dai mammiferi agli invertebrati. Le transglutaminasi sono codificate da una famiglia di geni strettamente correlati, con un alto grado di similitudine (Grenard et al., 2001). Inoltre, tutti i geni isolati fino ad ora sembrano essere organizzati in maniera simile (Figura 11). I geni per il fXIIIa (F13A1) e la TGasi 1 (TGM1) consistono di 15 esoni e 14 introni, mentre quelli per le TGasi 2-7 (TGM2-7) e la banda 4.2 (EPB42) sono formati da 13 esoni e 12 introni. Nei geni F13A1 e TGM1, l'equivalente esone 9 è stato diviso da un introne addizionale per dare gli esoni 10 e 11. In questi geni, l'esone 1 non è tradotto, e il pro-peptide ammino-terminale è codificato dall'esone 2. Varianti di splicing alternativo sono state identificate in diverse TGasi, come la TGasi 1, TGasi 2, TGasi 5 e nella banda 4.2 (Shevchenko et al., 2000; Kim et al., 1992; Citron et al., 2001; Bouhassira et al., 1992; Aeschlimann et al., 1998; Candi et al., 2001). Al contrario della somiglianza nell'organizzazione genica, le sequenze fiancheggianti in 5' i geni delle TGasi e i meccanismi della regolazione trascrizionale non sono omologhi, come ci si aspetta dalla diversa regolazione della loro espressione tissutale e durante lo sviluppo. Infatti, sebbene la regolazione dei geni delle TGasi non sia stata ben caratterizzata, sono evidenti le differenze nella struttura dei promotori e degli elementi enhancer (Grenard et al., 2001). Così, nonostante la loro struttura genica conservata, la grandezza della sequenza genomica è molto variabile, andando, dai 160 Kbp del gene per il fXIIIa ai soli 14 Kbp del gene codificante per la TGasi 1. Analisi filogenetiche indicano che inizialmente la duplicazione genica di un progenitore comune abbia dato origine a due differenti ramificazioni: una linea che comprende la TG1, il fXIIIa, la TG4 e le TGasi degli invertebrati; ed una seconda comprendente la banda 4.2, la TG2, la TG3, la TG5, la TG6 e la TG7. In seguito alla duplicazione, i diversi geni hanno subito un processo di divergenza e di dispersione nel genoma, come suggerisce la loro diversa localizzazione cromosomica (Figura 12). L'alta conservazione della sequenza e, quindi, un alto grado di conservazione della struttura secondaria, indica che tutte le TGasi potrebbero conservare una struttura a quattro domini, simile a quella già determinata per il fXIIIa, per la TGasi 2 umana e per la TGasi 3 umana (Yee et al., 1994; Liu et al., 2002; Ahvazi et al., 2002; Kim et al., 2001), con piccole variazioni dovute alle funzioni specializzate di ogni isoenzima.

INTRODUZIONE

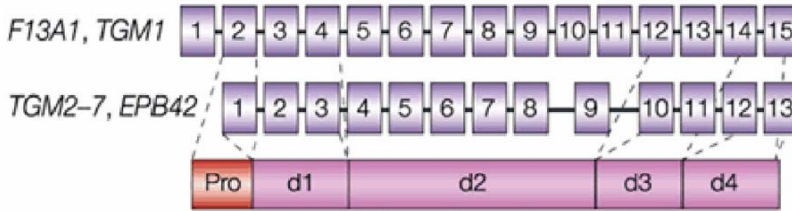


Figura 11. Schema dell'organizzazione genomica e domini proteici delle transglutaminasi. I geni per il fXIIIa e la TGasi 1 consistono di 15 esoni (numerati) mentre quelli per le TGasi 2-7 e la banda 4.2 consistono di 13 esoni. Le linee tratteggiate indicano gli esoni che codificano per i quattro domini (indicati d1-d4) delle proteine mature. Pro, propeptide del fXIIIa e della TGasi 1.

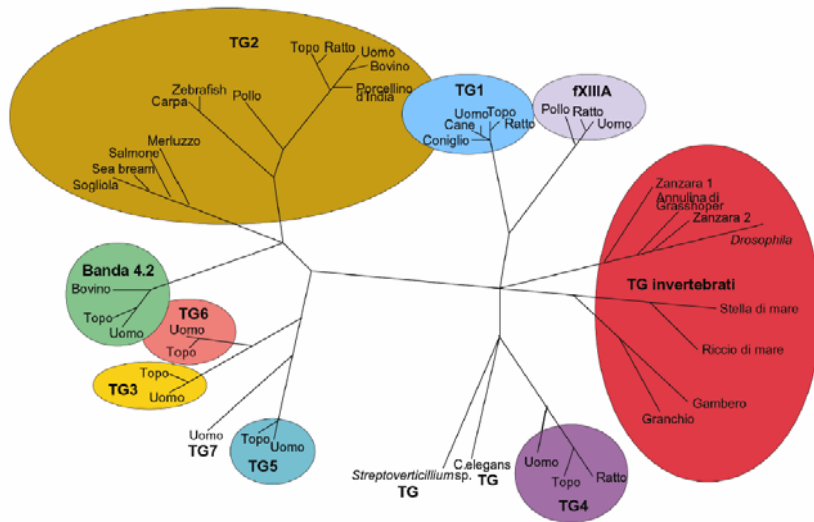


Figura 12. Albero filogenetico della famiglia delle transglutaminasi. L'albero è stato generato con Phylip sulle sequenze amminoacidiche allineate con CLUSTALW. I gruppi colorati indicano probabili ortologhi. La lunghezza dei rami è proporzionale al numero di sostituzioni accumulate. Si può notare la presenza di molti politomi (due o più rami che iniziano alla stessa posizione), che non possono essere risolti con le sequenze attualmente disponibili. Modificato da Lorand e Graham.

INTRODUZIONE

TG1	I	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	391		
TG2	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	293
TG3	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	289
TG4	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	283
TG5	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	294
TG6	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	295
FXIII	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	331
B42	I	L	L	L	L	R	K	Q	Q	L	Y	W	W	L	R	N	K	N	A	S	T	G	G	G	K	G	G	E	R	Y	C	F	-	Q	S	Q	Q	-	R	S	R	P	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	P	K	R	C	R	K	R	Y	Y	Y	F	Y	Y	G	G	G	Q	Q	Q	Q	C	C	C	C	C	W	V	V	V	V	F	F	F	F	A	A	G	A	G	A	G	V	V	T	I	V	V	V	T	A	L	L	M	M	F	A	T	T	T	T	T	L	L	R	R	R	R	S	A	L	L	L	G	G	G	L	I	I	A	P	P	P	P	P	P	284

Figura 13. Allineamento della sequenza amminoacidica delle TGasi umane a livello del sito attivo. Le linee indicano gli intervalli inseriti per ottimizzare l'allineamento delle sequenze. Le regioni nei rettangoli rappresentano gli amminoacidi conservati in almeno quattro prodotti genici. Le colonne grigie indicano la presenza di amminoacidi conservati in tutti i membri della famiglia delle transglutaminasi.

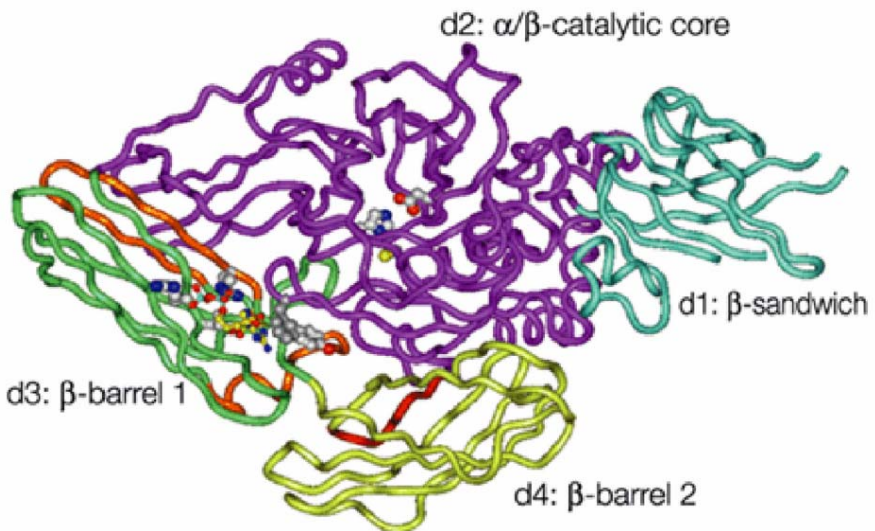


Figura 14. Struttura terziaria delle transglutaminasi. I domini d1-d4 sono indicati sulla struttura cristallina tridimensionale della TGasi 2. Sono indicati i domini funzionali, che includono i siti di legame con il recettore adrenergico α_{1b} (arancione) e il dominio di riconoscimento per la fosfolipasi $c\delta 1$ (rosso).

INTRODUZIONE

Tabella 4 | Omologia fra i membri della famiglia delle transglutaminasi

	Band4.2	fXIIIA	TGasi 7	TGasi 5	TGasi 4	TGasi 3	TGasi 2
TGasi 1	37%	51%	56%	45%	47%	47%	42%
TGasi 2	51%	47%	56%	56%	48%	54%	---
TGasi 3	47%	47%	58%	60%	56%	---	---
TGasi 4	46%	49%	49%	49%	---	---	---
TGasi 5	49%	48%	61%	---	---	---	---
TGasi 7	50%	47%	---	---	---	---	---
fXIIIA	41%	---	---	---	---	---	---

L'omologia è stata calcolata considerando le identità e le similitudini degli amminoacidi dell'intera sequenza proteica

Tabella 5 | Omologia fra i diversi domini dei membri della famiglia delle transglutaminasi

	β -sandwich	Catalitico	β -barrels 1	β -barrels 2
TG5 vs TG1	40% (24)	66% (51)	39% (19)	56% (30)
TG5 vs TG2	56% (35)	69% (56)	44% (20)	52% (35)
TG5 vs TG3	52% (30)	70% (56)	58% (33)	61% (38)
TG5 vs TG4	39% (24)	66% (48)	33% (14)	44% (20)
TG5 vs TG7	58% (48)	74% (62)	46% (31)	52% (35)
TG5 vs banda4.2	52% (34)	59% (42)	39% (16)	48% (22)
TG5 vs fXIIIA	36% (20)	65% (47)	37% (19)	47% (25)
TG2 vs TG1	42% (24)	62% (48)	35% (17)	49% (25)
TG2 vs TG3	52% (35)	61% (47)	50% (26)	50% (24)
TG2 vs TG4	39% (23)	63% (45)	28% (12)	50% (22)
TG2 vs TG7	56% (43)	69% (53)	41% (21)	48% (28)
TG2 vs fXIIIA	38% (22)	64% (50)	32% (20)	38% (24)
TG2 vs banda4.2	53% (19)	56% (40)	40% (17)	47% (25)
TG3 vs TG1	47% (25)	64% (49)	40% (15)	51% (30)
TG3 vs TG4	46% (28)	61% (48)	37% (15)	44% (20)
TG3 vs TG7	54% (35)	65% (52)	53% (22)	52% (29)
TG3 vs fXIIIA	37% (22)	61% (47)	42% (17)	39% (19)
TG3 vs banda4.2	53% (35)	50% (34)	45% (20)	42% (22)
TG1 vs TG4	48% (30)	69% (50)	44% (15)	50% (26)
TG1 vs TG7	41% (28)	62% (50)	35% (17)	49% (27)
TG1 vs fXIIIA	50% (31)	70% (54)	56% (32)	49% (33)
TG1 vs banda4.2	38% (23)	53% (35)	41% (18)	35% (16)
TG4 vs fXIIIA	41% (21)	64% (20)	41% (14)	41% (22)
TG4 vs banda4.2	42% (23)	56% (38)	34% (15)	41% (18)
TG4 vs TG7	36% (24)	65% (48)	33% (15)	49% (32)
TG7 vs fXIIIA	40% (20)	61% (42)	38% (15)	39% (22)
TG7 vs banda4.2	57% (39)	55% (38)	40% (17)	50% (25)
fXIIIA vs banda4.2	36% (19)	54% (34)	38% (17)	32% (13)

(.)percentuale di identità

Questa struttura comprende il dominio “ β -sandwich” nella porzione amino-terminale, il dominio catalitico centrale contenente il sito attivo e la triade catalitica (Figura 13) e i domini “ β -barrels1” e “ β -barrels2” nella porzione carbossi-terminale (Figura 14). Un’analisi comparativa delle sequenze proteiche delle diverse transglutaminasi, nella regione comprendente l’intero prodotto genico, rivela un’alta omologia, spesso la metà degli amminoacidi sono conservati o comunque sostituiti in maniera conservativa (v. tabella 4). La stessa analisi comparativa ripetuta confrontando i diversi domini strutturali che compongono le transglutaminasi rivela che l’omologia di sequenza è particolarmente pronunciata nel dominio catalitico, contenente il sito attivo e la triade catalitica (v. tabella 5). Le regioni fiancheggianti questo dominio, comprendenti i siti di legame per il substrato e i siti regolatori, presentano sostanziali differenze, ancora più pronunciate nei membri appartenenti a diverse linee filogenetiche. Sono proprio queste regioni addizionali a spiegare le proprietà uniche di ciascun membro della famiglia.

1.8 Transglutaminasi epidermiche

Tra i membri della famiglia delle transglutaminasi, gli enzimi TGasi 1, 3 e 5 sono coinvolti nella formazione dell’involucro corneo.

1.8.1 La TGasi 1 o TGasi cheratinocitica

La TGasi 1 è un enzima associato alla superficie interna della membrana dei cheratinociti (Goldsmith and Martin, 1975). È una proteina di 814 aminoacidi, con un peso molecolare teorico di 90 kDa (Kim et al., 1991). Viene espressa in tutta l’epidermide, soprattutto negli alti strati spinoso e granuloso (Schroeder et al., 1992), ma anche nello strato basale e nei follicoli piliferi (Kim et al., 1995), ed ha un ruolo fondamentale nella formazione dell’involucro corneo nei cheratinociti. L’espressione del gene per la TGasi1 può essere indotta dal Ca^{2+} (Floyd & Jetten, 1989; Polakowska et al., 1991; Yada et al., 1993), dal TPA (12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate; Liew & Yamanishi, 1992; Dlugosz & Yuspa, 1994; Yamanishi et al., 1992), dal ganglioside GQ1b (Yada et al., 1993) e dall’interferone γ (Saunders et al., 1994) in cheratinociti in coltura. La regione 5’ a monte di TGM1 ha attività di promotore e contiene siti di risposta per il TPA, sia *in vitro* (Yamada et al., 1994) che *in vivo* (Yamada et al., 1997). La TGasi 1

INTRODUZIONE

viene sintetizzata come enzima citosolico e successivamente viene acetilata con gli acidi grassi palmitato e miristato e ancorata alla membrana plasmatica (Chakravarty e Rice, 1989; Steinert et al., 1996b). L'acetilazione interessa un gruppo di cinque residui di cisteina in prossimità della porzione ammino-terminale dell'enzima, che si presenta altamente conservato (90%) nella sequenza amminoacidica della TGasi 1 umana e di ratto, mentre i restanti residui della porzione ammino-terminale hanno una omologia del 75% (Philips et al., 1990). Le cisteine sono fondamentali per l'acetilazione dell'enzima, e quindi per il suo ancoraggio alla membrana. Le modificazioni post-traduzionali della proteina determinano un aumento del 15% del peso molecolare (106 kDa), osservato tramite elettroforesi su gel denaturante, rispetto al peso molecolare teorico. Nei cheratinociti umani sono presenti anche delle forme solubili (citosoliche) dell'enzima, oltre alla forma di membrana di 106 kDa (Kim et al., 1995). In particolare, nelle cellule proliferanti dell'epidermide (strato basale) è presente la proteina completa (106 kDa) ancorata alla membrana plasmatica, mentre nei cheratinociti differenziati è stata identificata anche una forma solubile di 67 kDa, spesso complessata ad una forma di 33 kDa. Nei cheratinociti soprabasali in coltura, l'attività specifica della forma di 67 kDa è due volte più alta dell'attività del complesso solubile 67/33 kDa, che è dieci volte più attivo della TGasi1 ancorata alla membrana (Kim et al., 1995). Tuttavia, nei cheratinociti differenziati, esistono altre forme di TGasi1 ancorate alla membrana plasmatica, oltre a quella da 106 kDa. Quest'ultima, nei cheratinociti differenziati, può essere proteoliticamente tagliata in punti specifici a dare frammenti da 10, 33 e 67 kDa. Questi ultimi due frammenti costituiscono le forme citosoliche 67 e 67/33, probabilmente in seguito al loro ricambio dalla membrana plasmatica. Il frammento di 10 kDa rappresenta la regione ammino-terminale che subisce l'addizione dei gruppi acilici palmitato e miristato, e consente a tutto il complesso 10/67/33 di essere ancorato alla membrana (Steinert et al., 1996). Il frammento di 10 kDa corrisponde alla sequenza di circa 90 residui amminoacidici che precede il dominio a "β-sandwich" della TGasi 1. Quando l'enzima viene proteoliticamente attivato per generare il complesso 10/67/33 kDa, i siti di taglio sono localizzati in prossimità della giunzione tra il peptide transmembrana e il dominio ammino-terminale, e della giunzione tra il dominio catalitico ed il dominio "β-barrel" 1. In seguito all'attivazione proteolitica, che sembra essere mediata dalla catepsina D nei cheratinociti (Egberts F., 2004), la maggior parte TGasi 1 rimane associata con il frammento di 10 kDa per formare il complesso 10/67/33 kDa, unito da interazioni secondarie. Il complesso

10/67/33 kDa è altamente attivo, avendo un'attività specifica 100 volte maggiore della forma da 106 kDa e 20 volte più attivo delle forme citosoliche. E' quindi responsabile della maggior parte dell'attività transglutaminasica di tipo 1 dei cheratinociti differenziati (Steinert et al., 1996). Esistono quindi due condizioni necessarie perchè la TGasi 1 abbia la massima attività specifica: 1) la forma intera deve essere proteoliticamente attivata a formare la forma di membrana 10/67/33 kDa, 2) deve essere presente il frammento da 10 kDa, che quindi ha la duplice funzione di legare il complesso attivato alla membrana plasmatica e di regolare lo stato catalitico dell'enzima (Steinert et al., 1996, Candi et al., 1998). La TGasi 1 è quindi un enzima molto complesso, potendo esistere nei cheratinociti in forme multiple, sia solubili che ancorate alla membrana, processate da enzimi proteolitici in siti conservati. Sebbene la funzione specifica delle diverse forme enzimatiche non sia conosciuta, è stato ipotizzato che abbiano affinità diverse per i substrati (Kim et al., 1995) oppure che possano servire per accumulare l'enzima in uno stato inattivo (Steinert et al., 1996). Recentemente (Nemes et al., 1999) è stata trovata una nuova funzione della TGasi 1 legata alla membrana: quella di catalizzare la formazione di un legame estereo fra l'involucrina e una ω -idrossicerammide. Questo legame è importante perché crea un collegamento fra la struttura lipidica e quella proteica dell'involucro corneo. Il meccanismo di reazione è il seguente: dapprima si ha la formazione dell'intermedio labile acil-enzima tra la glutamina dell'involucrina e la cisteina presente nel sito attivo dell'enzima. Questo intermedio viene poi attaccato dal gruppo nucleofilo debole ω -idrossilico dell'idrossicerammide (che si trova in posizione adiacente all'intermedio acil-enzima) formando un legame estereo con fuoriuscita della TGasi 1. Questo legame avviene selettivamente sull'ossidrilico ω poiché gli altri ossidrilici dell'idrossicerammide sono glicosilati al momento in cui avviene tale reazione.

1.8.2. La TGasi 3 o TGasi epidermica

La TGasi 3 è un pro-enzima solubile che viene attivato mediante taglio proteolitico e il cui peso molecolare, dedotto sulla base della sequenza nucleotidica, è di 77 kDa. È codificata da un gene di 42.8 Kbp, costituito da 13 esoni e localizzato sul cromosoma 20 (Wang et al., 1994; Kim et al., 1994). È stata identificata per la prima volta nei follicoli piliferi umani (Chung e Folk, 1972). La sua espressione è confinata e specifica nella guaina

INTRODUZIONE

e nella cuticola (Thibaut et al., 2005). L'analisi mediante anticorpi monoclonali o policlonali specifici per la TGasi 3 ha dimostrato che la proteina è espressa negli strati superiori dell'epidermide, e mostra una distribuzione citoplasmatica diffusa, coerentemente con l'ipotesi che prevede per la TGasi 3 un ruolo nelle prime fasi di formazione dell'involucro corneo (Candi et al., 2002; Hitomi et al., 2003; Kalinin et al., 2002; Tarcsa et al., 1998). Recentemente è stato notato che la TGasi 3 viene normalmente espressa negli epitelii normali dell'esofago, ma la sua espressione è diminuita nei corrispondenti carcinomi (Chen et al., 2000). Poiché anche alcuni substrati della TGasi 3, come SPR3, S100A9 e S100A12, hanno un'espressione diminuita in questi tumori, è stato ipotizzato che la minore espressione di queste proteine e della TGasi 3 nei tumori dell'esofago provochi una formazione non corretta del complesso di differenziamento, causando quindi un disturbo della proliferazione cellulare e alterazioni maligne. È stato dimostrato che il promotore prossimale della TGasi3 contiene le informazioni sufficienti per avere un'alta espressione della proteina degli epitelii squamosi stratificati. Infatti, il promotore della TGasi3 contiene due siti di legame per Sp1 e ets, che interagiscono in maniera cooperativa per attivare la trascrizione del gene TGM3. Tuttavia, sembra che sia necessaria la presenza di altri fattori epidermici, la cui natura non è ancora nota, che potrebbero interagire con le sequenze promotrici distali del gene. La TGasi 3 è coinvolta negli eventi terminali del differenziamento dell'epidermide e dei suoi derivati; la sua attività enzimatica è stata infatti identificata unicamente nella porzione più esterna dello strato granuloso e nello strato corneo. La forma attivata della TGasi 3 è responsabile per più del 75% dell'attività TGasica totale dell'epidermide e del follicolo pilifero, anche se esperimenti di frazionamento cromatografico hanno dimostrato che la quantità di TGasi 3 nell'epidermide è inferiore a quella della TGasi 1 e della TGasi 2 (Kim et al., 1990). Sebbene non se ne capisca bene il significato biologico, l'mRNA della TGasi3 è espresso in numerosi tessuti al di fuori dell'epidermide, come il cervello, il testicolo, l'intestino, la milza e il rene (Hitomi et al., 1999; Kim et al., 1999; Hitomi et al., 2001). La forma pro-enzimatica presenta una bassa attività, ma in seguito al taglio proteolitico l'enzima (50 kDa) diviene altamente attivo (Kim et al., 1990). Non si conosce la natura della proteasi responsabile dell'attivazione della TGasi3, ma si presuppone che *in vivo* venga in qualche modo attivata durante il differenziamento epidermico. Recentemente è stata identificata la catepsina L come prima proteasi in grado di tagliare *in vitro* la TGasi 3 (Cheng et al., 2006) Il sito di attivazione proteolitica è localizzato a circa due

terzi della lunghezza della molecola, all'interno della regione più idrofila e flessibile della proteina (Kim et al., 1993). Queste osservazioni indicano che il pro-enzima potrebbe adottare una conformazione allungata in cui i due domini globulari, uno più grande ammino-terminale ed uno più piccolo carbossi-terminale, sono separati da una cerniera flessibile che corrisponde al sito di attivazione. La cerniera è probabilmente localizzata in prossimità della superficie della molecola ed è quindi accessibile alla proteasi responsabile della sua attivazione. La recente risoluzione della struttura cristallografica della TGasi 3 ha permesso di comprendere le modalità con cui la TGasi 3 viene attivata in seguito al taglio proteolitico e quali sono i cambiamenti conformazionali causati dal legame del calcio (Figura 15); Kim et al., 2001; Ahvazi et al., 2002; Ahvazi e Steinert, 2003). Come la TGasi 2, anche la TGasi 3 attivata è inibita in maniera allosterica dal GTP e dal suo analogo non idrolizzabile, il GTP γ S (Hitomi et al., 1999). Al contrario della TGasi 2, però, questa inibizione non è revertita dal Ca $^{2+}$, e l'ATP e l'ATP γ S non hanno alcun effetto sulla attività transglutaminasica, per cui si pensa che il meccanismo di interazione con il GTP sia diverso per la TGasi 2 e la TGasi 3 (Hitomi et al., 2000). Inoltre, finora non è stato ancora verificato se, dopo aver legato il GTP, la TGasi3 sia in grado anche di idrolizzarlo. Non è ancora ben chiaro il significato biologico di questa inibizione, che potrebbe essere una funzione accessoria del diretto progenitore delle TGasi2 e 3 (v. Fig.12).

1.8.3. La TGasi 5 o TGasiX

La TGasi 5, conosciuta anche come TGasi X, è uno degli ultimi membri della famiglia delle transglutaminasi ad essere stato identificato e parzialmente caratterizzato (Aeschlimann et al., 1998; Candi et al., 2001; Candi et al., 2002). L'enzima è costituito da 719 aminoacidi ed ha un peso molecolare di circa 81 KDa. Sono stati identificati, sia nella pelle umana che in cheratinociti in coltura, oltre alla forma intera dell'enzima, anche tre varianti di splicing alternativo, che non risultano essere attivi. L'espressione della TGasi 5 viene indotta, nei cheratinociti in coltura, in seguito a trattamento con agenti che inducono il differenziamento in queste cellule, come il Ca $^{2+}$ e il TPA, ma l'induzione è temporalmente diversa rispetto alle altre due transglutaminasi epidermiche, le TGasi 1 e 3 (Candi et al., 2001). Ulteriori studi hanno dimostrato che, similmente alla TGasi 2, la TGasi 5 oltre all'attività transamidasica, possiede anche la capacità di legare ed

INTRODUZIONE

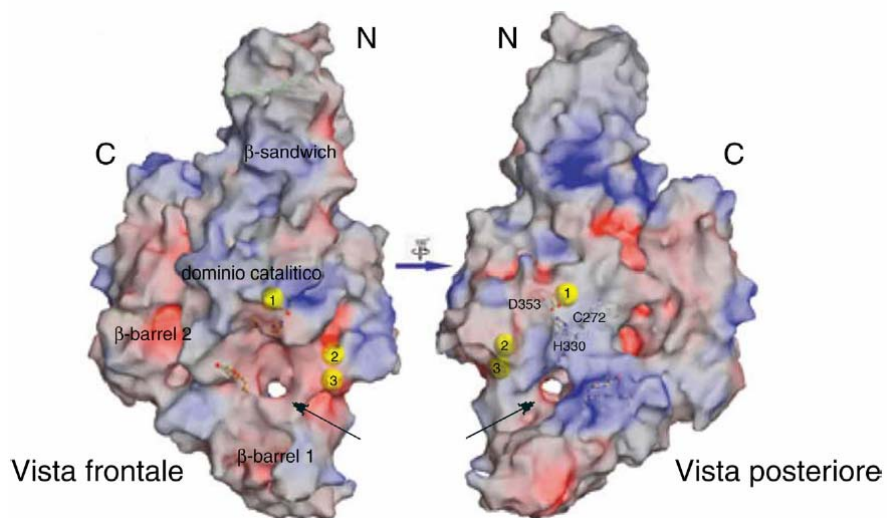


Figura 15. *Figura cristallografica della TGasi 3 umana attivata.* Nel modello è mostrato il potenziale elettrostatico della struttura della TGasi 3. A sinistra è mostrata la visione frontale del modello, mentre a destra quella posteriore. I colori variano dal rosso (gruppi acidi) al blu (gruppi basici). Sono indicati i quattro domini caratteristici delle transglutaminasi, la posizione della triade catalitica della TGasi 3 e dei tre ioni calcio legati all'enzima (in giallo). Le frecce indicano il canale che si viene ad aprire in seguito al legame del calcio. N, estremità amino terminale; C, estremità carbossi terminale.

idrolizzare il GTP, che agisce sulla TGasi5 come inibitore non competitivo (Candi et al., 2004). Studi biochimici hanno dimostrato che la forma intera della TGasi5 è attiva, ed utilizza con buona efficienza i substrati specifici dell'epidermide, come la loricrina, le SPRs e l'involucrina, ed i valori cinetici per questi substrati sono comparabili con quelli delle TGasi 1 e 3. Questi dati fanno pensare che effettivamente la TGasi 5 sia coinvolta nei primi stadi dell'assemblaggio dell'involucro corneo, durante il differenziamento epidermico. Ciò è stato ulteriormente confermato dall'analisi dell'espressione della proteina nella pelle umana (Candi et al., 2002). La TGasi 5 è normalmente espressa negli strati soprabasali dell'epidermide (Figura 16), dove segue un gradiente di espressione che aumenta progressivamente andando dallo strato basale fino allo strato granuloso. Lo studio dell'espressione della TGasi 5 in diverse malattie della pelle ha rivelato che l'enzima è deregolato nella malattia del Darrier e nell'ittiosi lamellare, mentre il quadro di espressione non sembra essere particolarmente modificato nella psoriasi e nell'ittiosi volgare (Candi et al., 2002). Sebbene non si comprenda ancora se la TGasi 5 sia coinvolta direttamente in queste patogenesi, sembra chiaro che l'espressione dell'enzima riflette l'alterazione del processo di differenziamento che si manifesta in queste patologie, a conferma di un ruolo attivo della TGasi 5 nel mantenimento dell'omeostasi dell'epidermide. La TGasi 5 è inoltre espressa nel follicolo pilifero al livello dell'IRS (strato interno della radice) e dell'ORS (strato esterno della radice) colocalizzando con l'involucrina (Thibaut et al., 2005). Non è ancora stata stabilita con sicurezza la localizzazione cellulare della TGasi 5. L'enzima risulta essere insolubile in tamponi contenenti detergenti non ionici, come il triton X-100, ed una completa solubilizzazione dell'enzima è possibile solo utilizzando agenti denaturanti, come SDS e UREA (Candi et al., 2001). Quando viene trasfettata nei cheratinociti in coltura, la TGasi5 risulta essere presente nel citoplasma, sotto forma di granuli, dove è principalmente localizzata in posizione perinucleare. Esperimenti di frazionamento cellulare e microscopia confocale hanno mostrato che l'enzima co-localizza con la rete di filamenti intermedi di vimentina, a loro volta insolubili, e questa possibile interazione potrebbe essere la spiegazione dell'insolubilità della TGasi 5. L'enzima è anche in grado di utilizzare la vimentina come substrato (Candi et al., 2001), come già descritto per altre transglutaminasi (Tucholski et al., 1999; Qian et al., 1997; Zatloukal et al., 1989). Il fatto che la vimentina sia espressa solo nei cheratinociti in coltura, ma non nell'epidermide (Franke et al., 1979) suggerisce che, oltre ad avere un ruolo nel differenziamento

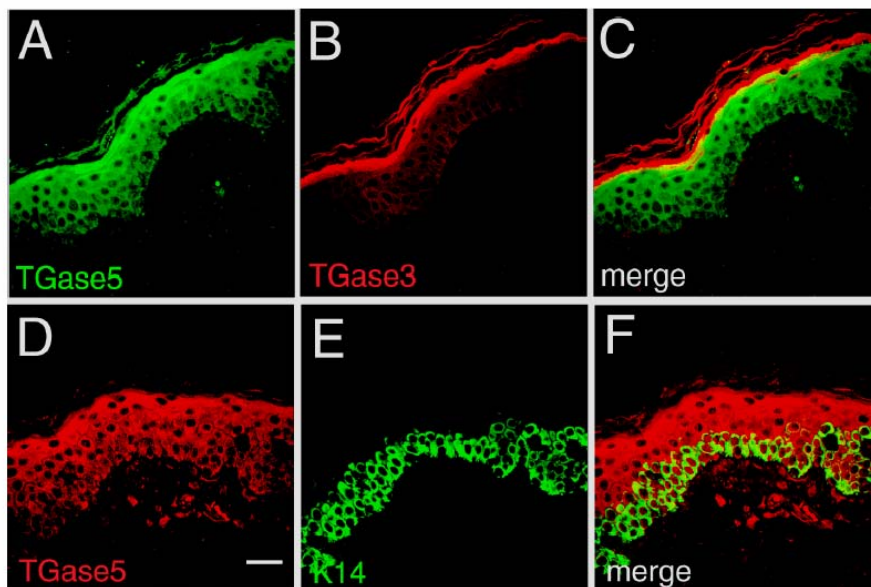


Figura 16. *Espressione della TGasi 5 nell'epidermide umana.* LA TGasi 5 (A e D) è espressa nell'epidermide umana, in particolare negli strati soprabasali, come dimostra la colorazione della K14 (E). L'enzima risulta avere un'espressione esclusiva rispetto alla TGasi 3 (B), che invece è riscontrabile negli strati più maturi della pelle.

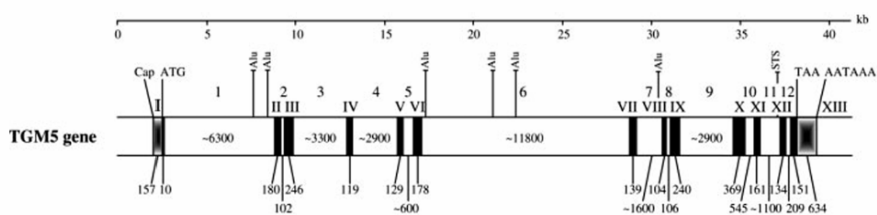


Figura 17. *Organizzazione genomica del gene TGM5 umano.* Il gene TGM5 umano è rappresentato con gli esoni numerati I-XIII e indicati dai rettangoli solidi, separati dagli introni 1-12. La tagli di esoni ed introni è data in bp. Le ragioni non tradotte in 5' e 3' negli esoni I e XIII, rispettivamente, sono indicati dai rettangoli ombreggiati, dove sono indicato gli elementi funzionali che definiscono il trascritto. Alu, retrotrasposone Alu derivato da 7SL; STS, sequenze tagged site.

INTRODUZIONE

epidermico, la TGasi 5 possa essere coinvolta in altri processi cellulari, laddove viene espressa anche la vimentina. In effetti, il cDNA della TGasi5 è stato trovato anche in altre linee cellulari, come fibroblasti e osteosarcomi (Aeschlimann et al., 1998). La TGasi 5 potrebbe avere un ruolo anche nella morte cellulare programmata. E' stato infatti osservato che l'enzima è in grado di indurre in overespressione apoptosi sia nelle cellule SK-N-Be che nelle cellule HEK-293 (Cadot et al, 2004). Recentemente, è stato isolato e caratterizzato il gene codificante per la TGasi5 umana (TGM5; Grenard et al., 2001). Il gene, della grandezza di 35 Kbp, si trova nella regione 15q15.2 del cromosoma 15, e consiste, come gli altri membri della famiglia delle transglutaminasi, di 13 esoni e 12 introni (Figura 17). Tutti i siti di splicing introne/esone sono stati confermati essere i classici siti GT/AG donatore/accettore. La grandezza degli introni varia considerevolmente, da 106 bp a più di 11 Kbp. L'analisi della regione 5' non tradotta ha rivelato che l'inizio della trascrizione si trova 157 nucleotidi a monte del codone di inizio della traduzione. La regione del promotore non presenta nessuna classica sequenza TATA-box, per cui potrebbe trattarsi di un promotore senza TATA. Sono stati trovati anche siti potenziali per il legame con AP1, SP1 e Ets, tipici dei geni cheratinocita-specifici. Siti potenziali per c-Myb, correlati con i fattori Ets sono stati trovati in una serie di promotori senza TATA box in geni coinvolti nell'ematopoiesi (Oh et al., 1999), e quindi questi siti potrebbero essere operativi nell'espressione della TGasi 5 in cellule ematopoietiche. Nella regione 3' non tradotta, è presente un classico segnale di poliadenilazione, circa 600 bp a valle del codone di terminazione. Un'ulteriore analisi delle sequenze genomiche vicine al gene della TGasi 5 ha mostrato la presenza in questo locus dei geni codificanti altre due transglutaminasi, EPB42 (la banda 4.2) e TGM7 (che codifica per la TGasi 7, non ancora caratterizzata; Grenard et al., 2001), disposti in tandem con TGM5 (Figura 18). Questi tre geni formano quindi un cluster di geni della famiglia delle transglutaminasi, simile a quello già trovato sul cromosoma 20, formato da TGM2 e TGM3, oltre che da un nuovo gene non ancora clonato, TGM6. Tutti e sei i geni dei due cluster sono stati trovati nel topo sulla parte distale del cromosoma 2 (Grenard et al., 2001). Questa scoperta suggerisce che i sei geni derivino dalla duplicazione locale di un singolo gene, e successivamente siano stati ridistribuiti in due distinti cromosomi nel genoma umano durante l'evoluzione.

INTRODUZIONE

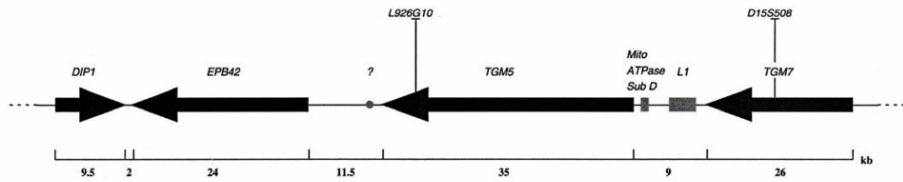


Figura 18. Schema del locus contenente il gene *TGM5* umano. Nello schema è mostrata l'organizzazione dei geni che codificano per la TGasi 5 (*TGM5*), per la banda 4.2 (*EPB42*) e la TGasi 7 (*TGM7*). Il locus contiene altri geni, quali *DIP1* (D-type cyclin-interacting protein), Mito ATPase Su D (mitochondrial ATPase subunit D pseudogene), *L1* (un elemento ripetitivo), diversi marcatori genici, e un EST (?). Sono indicate le grandezze dei geni (barra inferiore), espresse in Kbp.



Figura 19. Fenotipo dell'APSS. (a) L'APSS (Acral Peeling Skin Syndrome), malattia genetica autosomica recessiva, che coinvolge gli arti superiori ed inferiori. (b) In particolare la regione dorsale di mani e piedi. (c) E' accompagnata da eritemi estesi che si risolvono nel giro di alcuni giorni. (d) In seguito ad esposizione ad alto tasso di umidità ed elevate temperature si osserva un distacco della pelle a livello della giunzione tra lo strato granuloso e lo strato corneo.

1.8.4 TGasi 2 o TGasi tissutale

La TGasi2, una proteina monomerica (690 aminoacidi) il cui peso molecolare calcolato in base alla sequenza aminoacidica è di 77 kDa, è codificata da un gene localizzato sul cromosoma 20. Il sito attivo si estende dall'aminoacido 275 al 304; il residuo di cisteina del sito attivo è localizzato in posizione 277 e la molecola ha complessivamente 17 residui di cisteina, nessuno dei quali è coinvolto nella formazione di legami disolfuro. Inoltre, non contiene carboidrati, sebbene siano presenti sei potenziali siti di Nglicosilazione. Analogamente alle altre TGasi, è costituita da un dominio amino-terminale, da un dominio catalitico e da due domini "β-barrels". La TGasi 2 è una proteina citosolica, sebbene una piccola frazione (4-20%) risulta essere associata alle membrane (Chang e Chung, 1986; Korner et al., 1989), e un frammento N-terminale della proteina è legato ai pori nucleari, anche se non è ben nota la sua funzione (Singh et al., 1995). Può essere anche secreta, anche se non ne è stato spiegato il meccanismo, e va a localizzarsi sulla superficie cellulare. L'enzima presenta un'ampia distribuzione (Chung, 1972); studi di immunistoichimica, eseguiti su tessuti umani al fine di determinare la localizzazione *in situ* della proteina, hanno dimostrato che l'ampia distribuzione della TGasi 2 è determinata dalla sua espressione in cellule ubiquitarie, quali quelle endoteliali e muscolari lisce (Thomazy e Fesus, 1989). Inoltre, alcune cellule organo-specifiche come ad esempio gli eritrociti, i monociti, i mastociti, i fibroblasti, i macrofagi, i cheratinociti (Lichti et al., 1985) e le cellule istiociti-simili del polmone sintetizzano costitutivamente l'enzima (Thomazy e Fesus, 1989). La sua espressione nell'epidermide umana è localizzata esclusivamente nello strato basale (Candi et al., 2002). Quest'ultima è normalmente espressa a bassi livelli nella cellula, e l'incremento della sua espressione si ha solo dopo una prolungata esposizione a determinati stimoli, quali i retinoidi, la prostaglandina E2, l'interleuchina 6 ed il fattore di crescita tumorale βregione codificante per la TGasi2 hanno permesso di identificare gli elementi regolatori del suo promotore (Yan et al., 1996) Una volta che la TGasi 2 viene espressa, la sua attività enzimatica può essere regolata dal legame con diversi co-fattori, come il GTP, l'ATP e il Ca^{2+} . Il GTP e l'ATP (ed in maniera ancora più forte i loro analoghi non idrolizzabili, il GTPγS e l'ATPγS), complessati con Mg^{2+} , sono in grado di inibire l'attività transglutaminasica dell'enzima in maniera dose-dipendente (Achyuthan & Greenberg, 1987; Lai et al., 1996; Lai et al., 1998), legandosi in un sito posto fra il dominio catalitico ed il β-barrel 1. I residui chiave dell'interazione fra

enzima e nucleotide sono stati individuati tramite studi di cristallografia e mutagenesi *in vitro* (Liu et al., 2002; Iismaa et al., 2000). Oltre che legare il GTP, la TGasi 2 è anche in grado di idrolizzarlo (Lee et al., 1989). Il meccanismo dell'inibizione da parte del GTP è probabilmente dovuto a cambiamenti conformazionali dell'enzima (Di Venere et al., 2000), che stabilizzano l'enzima, incrementando l'energia libera richiesta per la sua denaturazione, e diminuiscono l'accessibilità al solvente, rendendo più difficile l'esposizione del sito attivo. Sebbene la TGasi2 sia stata la prima TGasi ad essere identificata, il suo ruolo fisiologico non è stato ancora determinato con esattezza; l'enzima sembra essere coinvolto in diversi processi cellulari come lo sviluppo embrionale, il controllo del differenziamento e l'apoptosi (o morte cellulare programmata) (Melino et al., 1994). Al contrario di altri membri della famiglia delle transglutaminasi, le funzioni biologiche della TGasi 2 sono molto diverse. Attualmente, comunque, non è stata trovata alcuna malattia genetica correlata con questo enzima. Topi transgenici mancanti di un gene funzionale per la TGasi 2 sono fenotipicamente normali alla nascita, non presentano anomalie durante lo sviluppo, l'induzione dell'apoptosi sia *in vitro* che *ex vivo* non presenta nessuna sostanziale differenza con topi del ceppo selvatico (De Laurenzi & Melino, 2001; Nanda et al., 2001). Ciò potrebbe dipendere dalla ridondanza fra le sue proprietà e quelle di altre transglutaminasi non ancora ben caratterizzate, come le TGasi 5, 6 e 7. Recentemente, sono state individuate alcune differenze fra i topi selvatici e quelli mancanti della TGasi 2: i fibroblasti hanno una minore adesività in coltura (Nanda et al., 2001); i macrofagi presentano una ridotta attività fagocitaria associata ad uno sviluppo di splenomegalia, autoanticorpi, e glomerulonefriti (Szondy et al., 2003); i topi mancanti della TGasi2 presentano una diversa secrezione di insulina indotta dal glucosio, per cui questi topi sviluppano ipoglicemia in seguito alla somministrazione esogena di insulina, un fenotipo che ricorda quello di pazienti affetti da MODY (maturity-on set diabetes of young), una forma di diabete di tipo 2 autosomica dominante, caratterizzata da una secrezione difettiva di insulina (Bernassola et al., 2002).

1.8.5 Altri membri della famiglia delle TGasi

La TGasi 4, o TGasi prostatica il cui cDNA è stato clonato e caratterizzato, è espressa specificamente nella prostata umana ed è implicata nel processo di coagulazione del seme (Grant et al., 1994). Il peso

molecolare di 77 kDa è stato dedotto dalla sequenza nucleotidica del cDNA e confermato da esperimenti di trascrizione/traduzione e successiva elettroforesi su gel denaturante (Dubbink et al., 1996). Il gene è stato localizzato sul cromosoma 3 nella regione 3p21.33-p22 (Gentile et al., 1995). Diversi studi sono stati compiuti sulla TGasi 4 di ratto, che presenta un'alta omologia con la forma umana. Storicamente, la transglutaminasi prodotta dalla prostata dei roditori può essere considerata come il primo membro della famiglia scoperto. Infatti, già nel 1896 era stato riconosciuto che le secrezioni della vescicola seminale dei roditori erano coagulati da un enzima, allora chiamato *vescicolasi*, presente nella secrezione prostatica (Camus e Gley, 1896). In seguito, è stato trovato che la proteina catalitica era prodotta nel lobo anteriore della prostata, chiamato anche ghiandola coagulante (Williams-Ashman, 1984). Le caratteristiche biochimiche di base dell'enzima e la formazione di legami crociati intermolecolari glutamminalisina delle proteine vescicolari secrete sono state descritte per la prima volta nel 1987 (Lorand e Williams-Ashman, 1987). Recentemente, è stato trovato che la transglutaminasi prostatica di ratto è una singola catena polipeptidica altamente glicosilata, del peso di 65 KDa, e possiede un'ancora lipidica che viene mantenuta durante la secrezione (Seitz et al., 1991). Riguardo al suo significato biologico, è generalmente accettato che la coagulazione catalizzata dalla TGasi 4 dello sperma dei roditori, che avviene nella vagina dopo il coito, con la risultante formazione di un tappo copulatorio, potrebbe aiutare la fertilizzazione, facilitando il passaggio degli spermatozoi attraverso la cervice uterina (Williams-Ashman, 1984). Una serie di studi condotti nel ratto su una delle principali proteine secrete presenti nella vescicola seminale suggerisce un ruolo biologico addizionale per la TGasi 4 (Paonessa et al., 1984; Porta et al., 1990; Porta et al., 1991). E' stato infatti dimostrato nel ratto che l'enzima produce forme polimeriche di questa proteina, che in questo modo acquista la capacità di legare le cellule spermatiche e sopprimere la loro immunogenicità. L'enzima avrebbe quindi nei roditori il ruolo di impedire il rigetto degli spermatozoi da parte degli elementi immunocompetenti presenti nel tratto genitale femminile. Lo stesso ruolo è stato ipotizzato anche nell'uomo, poiché è stata riscontrata attività transglutaminasica sia secreta nel plasma seminale umano che legata agli spermatozoi (Porta et al., 1986). Studi biochimici compiuti sulla TGasi 4 di ratto hanno dimostrato che l'enzima presenta una serie di modificazioni post-traduzionali (Esposito et al., 1996). In particolare, l'enzima presenta almeno due residui N-glicosilati, ed è stata confermata la presenza di lipidi legati direttamente alla catena polipeptidica. Sebbene la TGasi 4 di ratto sia

INTRODUZIONE

un enzima Ca^{2+} -dipendente come gli altri membri della famiglia, è stato notato che *in vitro* l'enzima risulta essere attivo anche in assenza di calcio aggiunto (Esposito et al., 1996). La TGasi 4 di ratto è capace di legare il GTP, ed una delle metodiche utilizzate per la purificazione prevede una cromatografia di affinità con questo nucleotide (Spina et al., 1999). Tuttavia non è noto se anche la TGasi 4, come la TGasi 2 e la TGasi 3, venga inibita dal legame con il GTP, né se è in grado di idrolizzarlo. Analisi di delezione hanno permesso di dimostrare che il dominio responsabile del legame con il GTP è situato nell'estremità N-terminale della TGasi 4, regione che sembra anche essere importante per l'attività catalitica dell'enzima. Infatti, il mutante privo dei primi 103 amminoacidi della TGasi 4 non è più in grado di legare il GTP, e perde la sua attività transglutaminasica (Mariniello et al., 2003). Il fattore XIII, l'ultimo fattore della cascata enzimatica della coagulazione, è una glicoproteina presente nel plasma in forma di eterotetramero inattivo costituito da due subunità catalitiche a di 79 kDa e da due subunità b di approssimativamente 90 kDa. Il fattore XIII esiste anche come dimero α_2 nelle piastrine, nei monociti e nella placenta. L'attivazione del pro-enzima avviene durante la fase terminale della coagulazione in seguito al taglio proteolitico della subunità a catalizzato dalla trombina in corrispondenza del legame Arg37/Gly38. L'azione della trombina promuove il rilascio di un peptide di attivazione (4 kDa) dall'estremità amino-terminale di ciascuna subunità a e la dissociazione delle subunità a e b. In presenza di ioni Ca^{+2} , il tetramero $\alpha_2\beta_2$ dissocia in un omodimero attivo α_2 ed in due subunità b. La forma attivata dell'enzima (fattore XIIIa), contenente l'attività TGasica, catalizza la formazione di legami isopeptidici ϵ -(γ -glutamil)lisina tra le catene laterali di molecole adiacenti di fibrina. In questo modo, il fattore XIII stabilizza il coagulo prodotto dall'aggregazione di monomeri di fibrina. La formazione di legami intermolecolari tra i monomeri di fibrina aumenta infatti notevolmente la forza meccanica, la stabilità e la resistenza alla proteolisi del coagulo. La resistenza e l'insolubilità del coagulo sono ulteriormente incrementati dalla sintesi di legami crociati tra la fibrina ed altre proteine plasmatiche, tra la fibrina e la fibronectina e tra quest'ultima ed il collagene. Il fattore XIIIa viene codificato da un gene di 160 Kbp, contenente 15 esoni (Ichinose e Davie, 1988), localizzato nella regione 6p24-25 del cromosoma 6 (Board et al., 1988). Il secondo esone codifica per il peptide di attivazione rilasciato dalla trombina, il settimo e l'undicesimo contengono le sequenze nucleotidiche che codificano rispettivamente per il sito attivo ed il presunto sito di legame per il calcio. La struttura primaria della subunità a, costituita da 731 amminoacidi, è stata determinata

INTRODUZIONE

combinando il clonaggio del cDNA con l'analisi diretta della sequenza aminoacidica. Il residuo di cisteina del sito attivo è localizzato in posizione 314. Il sito attivo contiene un residuo di istidina (His-373) che sembra aumentare la nucleofilicità del gruppo tiolico della cisteina 314, contribuendo così all'azione catalitica del fattore XIII. La banda 4.2 è un costituente ubiquitario della membrana plasmatica nella maggior parte delle cellule eucariote. E' uno dei principali componenti della membrana degli eritrociti umani dove rappresenta il 5% delle proteine totali. La banda 4.2 si associa con il dominio citoplasmatico della banda 3 (Korsgren e Cohen, 1986), una glicoproteina integrale, e con l'anchirina, un polipeptide localizzato sulla superficie citosolica della membrana eritrocitaria (Korsgren e Cohen, 1988). Le associazioni multiple della proteina suggeriscono che la banda 4.2 abbia un ruolo strutturale nella membrana degli eritrociti. La banda 4.2 degli eritrociti umani è una proteina di circa 75 kDa in cui il residuo critico di cisteina, localizzato all'interno della sequenza consenso del sito attivo e necessario per l'attività enzimatica delle TGasi, è sostituito da un residuo di alanina (Korsgren et al., 1990). In accordo con questa sostituzione aminoacidica, la proteina non presenta attività TGasica (Korsgren et al., 1990). D'altra parte, l'esistenza di identità e di omologia di sequenza tra la banda 4.2 e le TGasi giustifica il fatto che la proteina venga considerata un membro della famiglia delle TGasi. Recentemente sono stati caratterizzati altri membri appartenenti alla famiglia delle transglutaminasi: la TGasi 6 (TG_Y) e la TGasi 7 (TG_Z) (Grenard et al., 2001). Il gene *TGM7* è stato scoperto mappare a circa 9 kb a monte del gene *TGM5*, sul cromosoma 15q15. La struttura richiesta per la specifica attività transglutaminasica ed il legame con il Ca²⁺ risulta essere altamente conservata, in particolare i residui appartenenti alla triade catalitica (Cys279, His338, and Asp361) ed il dominio catalitico sono altamente conservati se paragonato alla sequenza degli altri membri della famiglia. La TGasi 7 è espressa nelle cellule di osteosarcoma (MG-63), nei fibroblasti (TJ6F, HCA2), nei cheratinociti primari, nelle cellule epiteliali di carcinoma mammario (MCF7), nelle cellule HELA, nei testicoli, pelle, cervello, cuore, rene, polmone, pancreas, placenta, muscolo scheletrico, fegato, prostata, e nel carcinoma della prostata. L'ultimo membro caratterizzato delle famiglia delle transglutaminasi è la TGasi6 o TGasiY. Il gene *TGM6* mappa nelle vicinanze del gene *TGM3* sul cromosoma 20q11/12, ma non se ne conosce la distribuzione tissutale.

1.9 Malattie genetiche in relazione con l'involucro corneo

Difetti in ciascuno dei componenti strutturali o nei processi enzimatici che coinvolgono la formazione ed il mantenimento dell'epidermide e dello strato corneo, danno luogo ad una serie di malattie della pelle definite "disordini della cheratinizzazione" o *Genodermatosi*. Sono caratterizzati dalla presenza di un ispessito strato corneo, ipercheratinizzato, dalla presenza di scaglie desquamanti ed in alcuni casi da manifestazioni più gravi come la presenza di bolle dovute allo scollamento dell'epidermide dallo strato sottostante o dal fallito completamento dello sviluppo delle terminazioni degli arti. Le genodermatosi sono così definite perché sono determinate da difetti genetici. Si tratta di un gruppo eterogeneo di patologie in cui le caratteristiche cliniche ed istopatologiche sono molto variabili e spesso sovrapponibili. Per questi motivi e a causa della loro rarità, la loro classificazione è estremamente complessa. L'incidenza per alcuni tipi è molto bassa, circa 1:100.000/250.000, ma hanno comunque un impatto sociale notevole, in quanto sono malattie spesso disfiguranti che costringono i pazienti ad una bassa qualità di vita e che possono comportare notevoli problemi psicologici e sociali. In generale, si tratta di malattie deturpanti ma raramente letali, che si presentano con gradi di severità variabile.

1.9.1. Malattie genetiche relative alle TGasi

1.9.2 Ittiosi Lamellare

L'importanza della TGasi 1 in un corretto differenziamento epidermico è evidente in alcune situazioni patologiche per l'uomo. In particolare, mutazioni nel gene codificante per la TGasi 1 sono state trovate in pazienti affetti da ittiosi lamellare, un disturbo congenito della cheratinizzazione che si trasmette in maniera autosomica recessiva, caratterizzato da pelle sottile e squamosa (Huber et al., 1995a; Hazell et al., 1985; Hohl et al., 1993; Huber et al., 1995b; Parmentier et al., 1995; Russel et al., 1994). Spesso, i pazienti affetti alla nascita presentano una membrana ruvida che li circonda, molto fragile, per cui vi è un alto rischio di infezioni e disidratazione. I principali cambiamenti istologici dell'ittiosi lamellare riguardano un disturbo della formazione dello strato corneo o del differenziamento epidermico. E' stata anche trovata una funzione di barriera della pelle ridotta in studi di perdita d'acqua associata ad un cambiamento nei lipidi dello strato corneo (Lavrijsen et al., 1995). Molte delle sostituzioni riscontrate nel gene della TGasi 1 in pazienti affetti da ittiosi lamellare risultano nella perdita della funzione dovuta alla mancata formazione di interazioni ioniche e di legame idrogeno che hanno un ruolo determinante nel garantire l'attività enzimatica. Questi cambiamenti probabilmente causano un ripiegamento non corretto della proteina con conseguente perdita di attività. Altre mutazioni vanno invece ad interferire con l'attivazione proteolitica della TGasi 1, necessaria per l'attività dell'enzima in cheratinociti differenziati (Candi et al., 1998). Recentemente, sono stati prodotti topi transgenici mancanti del gene codificante per la TGasi1 (Matsuki et al., 1998). I topi omozigoti per la mutazione muoiono alla nascita, mancando di un involucro corneo normale e con una funzione di barriera della pelle destabilizzata, un marcato incremento della permeabilità ai coloranti della pelle ed una forte disidratazione. La pelle dei topi neonati KO per la TGasi1 è rigida ed eritrodermica, ma quando viene trapiantata si sviluppa in una pelle che ricorda quella di pazienti affetti da ittiosi lamellare, con iperplasia epidermica e ipercheratosi marcata (Kuramoto et al., 2002), probabilmente come compensazione fisica per la permeabilità cutanea difettiva, richiesta per la vita nell'ambiente terrestre. I topi eterozigoti per la mutazione, invece, presentano un fenotipo normale. Questi dati recenti dimostrano non solo l'importanza della TGasi 1 nella corretta formazione dello strato corneo, ma anche che per la TGasi 1 non esiste ridondanza, non potendo essere sostituita

da un'altra TGasi per svolgere le sue funzioni durante il differenziamento epidermico.

1.9.3 Acral Peeling Skin Syndrome

La Peeling Skin Syndrome (PSS [MIM 270300]) è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da una continua frattura dello strato esterno dell'epidermide (Kurban and Azar 1969; Levy and Goldsmith 1982; Abdel-Hafez et al. 1983; Silverman et al. 1986; Mevorah et al. 1987; Judge et al. 2004) (Figura 19). L'analisi istologica e dell'ultrastruttura ha mostrato in molti casi la frattura si trova negli strati sovrabasali dell'epidermide, esattamente al livello della giunzione tra lo strato granuloso e lo strato corneo. La malattia è quindi distinguibile istologicamente dalle diverse forme di epidermolisi bullosa, in cui la frattura può avvenire nei cheratinociti dello strato basale dell'epidermide (forme semplici) (Lane and McLean 2004) o all'interno o vicino la lamina basale dermica/epidermica (variante delle giunzioni; Uitto and Richard 2004). In alcuni casi di PSS, il distacco della cute è accompagnato da eritema, lesioni vescicolari, o in rari casi da altri sintomi come fragilità del capello e anomalie delle unghie. Sono stati identificati due sottotipi principali: non infiammatorio (tipo A) e infiammatorio (tipo B) (Traupe 1989; Judge et al. 2004), comunque, è oramai accertata dalla letteratura dermatologica la presenza di ulteriori sottotipi. In alcune famiglie è stata osservata una forma acrale di PSS (APSS) in cui il distacco della cute è limitato alla regione dorsale delle mani e dei piedi ed a conferma, un'analisi istologica e ultrastrutturale ha mostrato elevati livelli di vescicolazione nell'epidermide a livello della giunzione tra lo strato granuloso e lo strato corneo (Shwayder et al. 1997; Hashimoto et al. 2000). La sintomatologia della malattia ha condotto gli studi sulle transglutaminasi (TGasi) (Cassidy et al. 2005; Eckert et al. 2005). Questo processo risulta particolarmente importante nei processi finali del differenziamento epidermico ove le transglutaminasi determinano il cross-link tra le cheratine e proteine strutturali specifiche come l'involucrina, la loricrina, la filaggrina e le piccole proteine ricche in prolina, determinando la formazione dell'involucro corneo, lo strato più esterno dell'epidermide (Kalinin et al., 2002). Questo strato più esterno dell'epidermide ha il compito di svolgere la funzione principale di barriera contro l'ambiente esterno.

2.1 **Mus musculus come modello animale nella ricerca**

Negli ultimi anni il topo è stato scelto più volte come modello animale nello studio dei vari aspetti dello sviluppo e della fisiologia dei mammiferi (Paigen, 1995). Esso è risultato il modello ideale nella ricerca biomedica in quanto è un animale di taglia piccola, ha un ciclo riproduttivo breve, è l'organismo più studiato geneticamente e, cosa più importante, è molto semplice introdurre precise alterazioni genetiche nelle sue cellule staminali embrionali e trasferirle successivamente in una linea stabile. Numerose altre specie animali come il moscerino, i vermi, e i pesci zebra, sono stati utilizzati per esperimenti di mutagenesi per studi sullo sviluppo e su processi molecolari; comunque mammiferi come il topo sono risultati gli organismi migliori come modelli animali mimando fenotipicamente malattie e sindromi dell'uomo (Darlind e Abbott, 1992). Alla fine degli anni '80 si è verificato un grande passo avanti nella genetica molecolare del topo grazie alla convergenza di due campi di ricerca: da una parte, lo sviluppo di tecniche di analisi e di isolamento di eventi rari di ricombinazione omologa in cellule di mammifero (Doetschman et al., 1987; Thomas e Capecchi, 1987) e, dall'altra parte, lo sviluppo della tecnologia delle cellule staminali embrionali (ES) (Robertson, 1987). Modelli animali di malattie umane sono risultati importanti nella ricerca biomedica in quanto ci aiutano a capire la patogenesi di una malattia e ci permettono di sviluppare strategie terapeutiche nello studio dell'efficacia di nuovi trattamenti, prima di applicarli in lunghe e costose sperimentazioni cliniche. In molti casi, la mancanza di modelli animali non ha permesso progressi nello studio di malattie genetiche debilitanti e fatali per l'uomo.

2.2 **Background genetico nelle linee murine**

Gli studi sulla genetica del topo sono iniziati ufficialmente agli inizi del ventesimo secolo con lo sviluppo del primo ceppo parentale, DBA (Morse 1981; Hogan et al., 1994). Da questi primi studi iniziali il numero di ceppi parentali creati ha raggiunto il numero di più di 450 (Festing, 1994). Questi ceppi vengono prodotti dopo almeno venti generazioni consecutive di accoppiamenti tra fratelli e originariamente erano stati sviluppati per studi sul cancro (Morse, 1981). Comunque, i ceppi parentali murini differiscono per diversi aspetti oltre alla suscettibilità ai tumori, fornendo in questo modo modelli per molte altre malattie oltre al cancro (Bedell et al., 1994). Alcuni

INTRODUZIONE

ceppi parentali mutanti hanno però mostrato un alto grado di variabilità fenotipica tra singole linee murine. Ciò è probabilmente dovuto ad un background genetico misto da cui spesso derivano i mutanti. Comunque ad oggi sono disponibili diverse linee parentali per studi genetici come la creazione di geni knock-out. Sebbene ci siano molti fattori da tenere in considerazione nella creazione di un ideale modello di topo knock-out, non bisogna dimenticare di analizzare le caratteristiche del ceppo parentale nel quale si vuol generare la linea murina prima che un progetto così vasto sia portato a termine (Erickson, 1996; Gerlai, 1996). Un esempio degli effetti del background genetico sull'utilità di un modello di topo knock-out è quello del gene per la fibrosi cistica che mostra differenze considerevoli nella gravità del fenotipo, variando tra un fenotipo medio (Dorin et al., 1992) ed un fenotipo grave (Snouwaert et al., 1992). Queste differenze sono principalmente dovute alla debole espressione del gene bersaglio mutato nel modello murino con il fenotipo medio. Può accadere che alcuni modelli animali per geni knock-out non mostrino nessun fenotipo apparente ponendo quindi dei problemi per i ricercatori intenti ad eseguire un'analisi fenotipica. Questo può accadere nel caso in cui il gene non sia funzionale durante lo sviluppo. I cambiamenti che avvengono dovuti all'assenza di un gene durante tutta la vita di un topo possono anche dare luogo ad un fenotipo inaspettato in età adulta. Un'altra possibilità potrebbe essere che l'assenza di un dato gene sia compensata dalla presenza di altri geni. Negli anni '40, Gorge Snell fu il primo che sviluppò un nuovo tipo di ceppo parentale, il ceppo congenico, per isolare loci che influenzano il trapianto di tessuti. Come i ceppi parentali, anche i ceppi congenici si sono dimostrati molto utili nella ricerca su malattie genetiche. Questi ceppi si ottengono trasferendo un segmento cromosomico contenente un locus, un tratto fenotipico o una mutazione di interesse da un ceppo all'altro attraverso dieci o più accoppiamenti effettuati tramite la selezione ad ogni generazione del cromosoma ricevuto che contiene il segmento di interesse. Dopo dieci accoppiamenti il nuovo ceppo congenico differisce dal ceppo originario con una regione di media di solo 20-cM che rappresenta il segmento sul cromosoma ricevuto. In alcuni casi, il fenotipo del ceppo congenico può differire significativamente rispetto al ceppo donatore. L'adeguata selezione di un ceppo murino per la creazione di un topo knock-out può avere un notevole effetto sul fenotipo, nel caso in cui geni non correlati, facenti parte del background genetico, influenzino significativamente il fenotipo della malattia.

2.3 Generazione di chimere da cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (ES) sono cellule embrionali pluripotenti che derivano dalla massa cellulare interna di embrioni allo stadio di blastocisti e partecipano alla generazione di tutte le linee cellulari, comprese quelle della linea germinale, trasmettendo così il loro genotipo alle generazioni successive (Cohen-Tannoudji e Babinet, 1998). Normalmente il ceppo murino delle cellule ES è di tipo 129, non C57BL/6, in quanto quest'ultimo risulta essere meno efficiente nella partecipazione alla formazione degli altri tessuti in fase embrionale. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato che nonostante le cellule staminali embrionali di tipo C57BL/6 siano meno efficienti nel colonizzare l'embrione in sviluppo esse risultano però in grado di originare una quantità maggiore di topi fertili per la generazione della progenie successiva (Seong et al., 2004). Il primo passo per l'introduzione ad esempio di particolari mutazioni all'interno di geni endogeni è la creazione del vettore contenente la mutazione prescelta e la sua successiva introduzione, mediante l'elettroporazione, in cellule staminali embrionali. Il vettore per la ricombinazione contiene un marker per la selezione positiva dei cloni, normalmente la resistenza alla neomicina (G418), per selezionare quei cloni cellulari in cui la ricombinazione ha avuto luogo. Il secondo passaggio prevede l'utilizzo di queste cellule staminali embrionali per generare chimere murine capaci di trasmettere il gene mutato alla progenie. Ciò si realizza iniettando le cellule staminali embrionali che contengono il gene con la mutazione in una blastocisti. (Figura 20). Questi embrioni vengono quindi trasferiti chirurgicamente in una madre pseudogravida che porti a termine così lo sviluppo dell'embrione. Solitamente per facilitare l'isolamento della progenie desiderata, le cellule staminali embrionali e la blastocisti derivano da linee murine facilmente distinguibili per il colore del pelo (cellule embrionali da una linea aguti e blastocisti da una linea nera). Il contributo dato dalle cellule staminali embrionali può essere determinato osservando il colore del pelo della progenie che deriva dall'accoppiamento del topo chimerico con un topo nero. Al giorno d'oggi qualsiasi tipo di mutazione può essere introdotta in un gene murino, da una mutazione silente ad una mutazione puntiforme, ad un riarrangiamento cromosomico come grandi delezioni, traslocazioni o inversioni (Hasty et al., 1991; Valancius e Smithies, 1991; Wu et al; 1994; Ramirez-Solis et al., 1995). Dal 1961, data in cui fu creata dall'uomo la prima chimera (Tarkowski, 1961), ad oggi le tecniche per la fusione di due

INTRODUZIONE

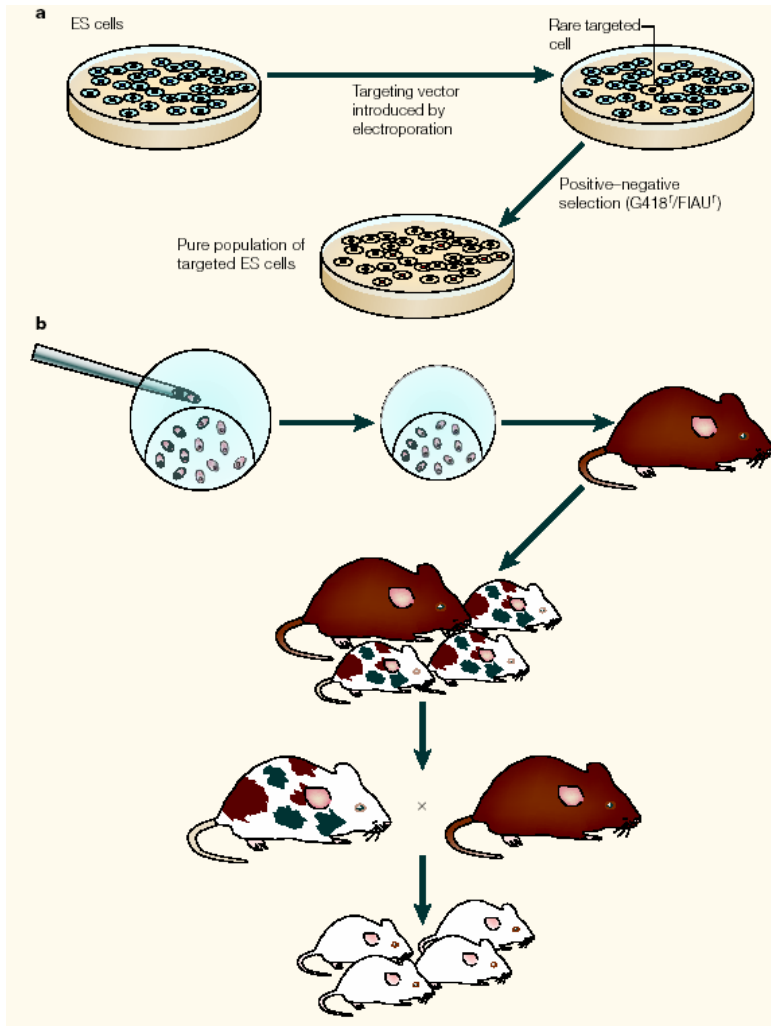


Figura 20. *Generazione di chimere murine per la linea germinale da cellule staminali embrionali contenenti la mutazione desiderata.* (a) Nel primo passaggio viene isolato il clone staminale contenente la mutazione desiderata. (b) Nel secondo passaggio queste cellule vengono utilizzate per generare una chimera murina in grado di trasmettere il gene mutato alla progenie.

embrioni separati si sono semplificate e sono state sviluppate delle tecniche microchirurgiche completamente diverse per la creazione di chimere embrionali ed animali. Inoltre, oggi le chimere possono essere prodotte non solo mettendo insieme due diversi embrioni, ma anche unendo un embrione con cellule di teratocarcinoma, cellule staminali embrionali (ES) e cellule germinali embrionali (EG).

2.4 Ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali murine

Gli studi fatti negli ultimi anni dello scorso secolo, in particolare quelli di Smithies e Capecchi, hanno dimostrato che le cellule di mammifero posseggono l'apparato enzimatico necessario per la ricombinazione tra DNA esogeno ed una sequenza omologa presente sul cromosoma *in situ*, anche se questo evento è piuttosto raro paragonandolo all'integrazione casuale dello stesso DNA (Smithies et al, 1985; Wong e Capecchi, 1986). Il topo si è dimostrato il miglior organismo modello per l'utilizzo di questa tecnica applicata allo studio della genetica dell'uomo.

2.5 Classi di vettori per la ricombinazione

I vettori per la ricombinazione possono essere classificati in due categorie: vettori di sostituzione o vettori d'inserzione. Nella prima classe il vettore per la ricombinazione viene linearizzato in modo che esso rimanga colineare con la sequenza bersaglio. La sequenza cromosomale viene sostituita così con un doppio evento di "crossing over" che include le regioni omologhe fiancheggianti (Figura 21a). Il vettore d'inserzione viene linearizzato invece all'interno della regione di omologia in modo che la ricombinazione omologa conduca ad una duplicazione della sequenza genomica (Figura 21b), ma quest'ultima classe risulta essere la meno utilizzata per gli eventi di ricombinazione (Muller et al., 1999).

2.6 Introduzione di piccole mutazioni attraverso la creazione di topi "knock-out"

Piccole mutazioni come l'inserimento di un codone di stop oppure le sostituzioni aminoacidiche possono essere realizzate attraverso l'utilizzo di

INTRODUZIONE

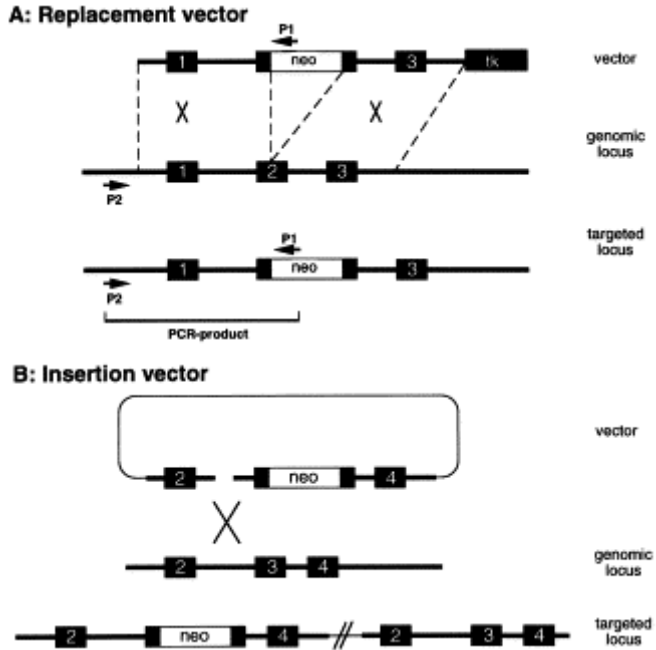


Figura 21. *Classificazione dei vettori per la ricombinazione.* (a) Nel vettore di sostituzione l'esone 2 del gene bersaglio viene sostituito dal gene che codifica per la resistenza alla neomicina (neo) dopo la ricombinazione omologa e la linearizzazione del vettore. Il gene HSV-tk viene perso dopo la ricombinazione omologa. (b) Il vettore d'inserzione viene linearizzato tra l'esone 2 e 3 del gene bersaglio. La ricombinazione omologa porta all'integrazione del vettore ed a una parziale duplicazione genica. Le linee sottili rappresentano lo scheletro del vettore.

due principali tecniche: la prima è conosciuta come “Hit and run” mentre la seconda è chiamata “Tag and exchange”

2.6.1 “Hit and run”

Questa tecnica comporta l'introduzione di una mutazione attraverso due passaggi. (Figura 22a). Il primo passaggio richiede la ricombinazione omologa attraverso l'utilizzo di un vettore inserzionale, che determina una parziale duplicazione del locus separata dalla sequenza del plamide e dei due geni marcatori. Il costrutto contiene infatti oltre la mutazione prescelta sia un marker di selezione positiva (la resistenza alla neomicina, *neo*) che uno di selezione negativa (gene per la timidina chinasi del virus herpes simplex, *tk*). Dopo una prima selezione positiva dei cloni mediante G418, essi vengono selezionati negativamente mediante l'utilizzo di ganciclovir (un nucleotide analogo atossico metabolizzato come tossico dall'enzima della timidina chinasi) che permette il recupero dei rari cloni revertanti che hanno perso il gene marcatore della timidina chinasi. Questi revertanti infatti ovviano alla parziale duplicazione attraverso un singolo evento di ricombinazione reciproca intracromosomale, determinando l'excisione della sequenza duplicata e della cassetta per la selezione della timidina chinasi, creando così l'allele modificato desiderato. Questa tecnica è stata usata con successo per la creazione di cellule staminali embrionali e linee murine mutate (Valancius e Smithies, 1991; Ramirez-Solis et al., 1993; Wu et al., 1994; Horan et al., 1995; Horie et al., 1995; van Doornick et al., 1995; MacMillan et al., 1996; Toth et al., 1996; Takaesu et al., 1997). Questo metodo presenta comunque dei lati negativi. Innanzitutto la modificazione può risiedere nella regione della sequenza che viene excisa nel secondo passaggio, ricreando quindi un allele wild-type resistente al ganciclovir. Un altro aspetto è legato alla ricombinazione intracromosomale, evento raro tra due loci specifici, che può risultare limitante per un efficiente processo di excisione in alcuni loci. Ciò può spiegare il raro utilizzo di questa tecnica nella creazione di linee knock-out murine.

2.6.2 “Tag and exchange”

La strategia del “tag and exchange” o “double replacement” (Askev et al., 1993; Stacey et al., 1994; Wu et al., 1994) richiede due differenti vettori di

INTRODUZIONE

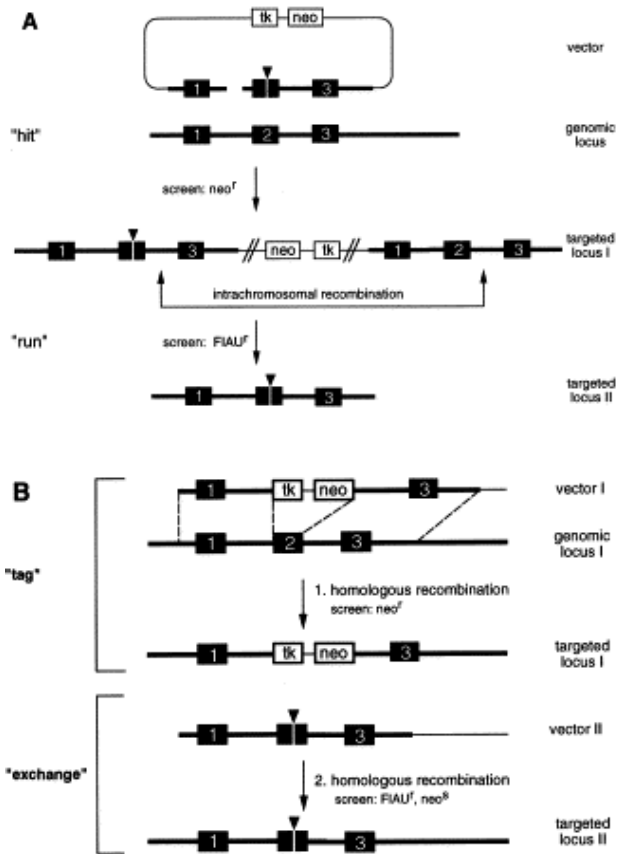


Figura 22. Strategia “hit and run” e “tag and exchange”. (a) Il gene bersaglio (cassetta in nero) presenta una regione di omologia con il vettore contenente la mutazione puntiforme in uno dei suoi esoni (freccia nera). I due geni per la selezione si trovano sul vettore all'esterno della zona di omologia. La resistenza alla neomicina (*neo*) consente di individuare i cloni in cui è avvenuta la ricombinazione omologa con il gene bersaglio determinando una parziale duplicazione del locus. Un successivo evento di ricombinazione intracromosomale nell'allele interessato determina l'instaurarsi della mutazione puntiforme ed il rilascio della sequenza esogena. La selezione negativa permette di individuare l'evento. (b) Nella tecnica “tag and exchange” il primo vettore ricombina inizialmente inserendo i due marcatori di selezione (*neo* e *tk*). Il marcatore positivo viene utilizzato per la selezione dell'evento. Un secondo vettore che porta la mutazione prescelta, ma non contiene marcatori di selezione, ricombina omologamente ed i cloni selezionati sono quelli tk⁻. FIAU: analogo del gancyclovir. neo^r =resistenza alla neomicina.

ricombinazione. Nella prima ricombinazione omologa il vettore utilizzato contiene un marcatore di selezione positiva (*neo*) ed uno di selezione negativa (*tk*), ma soltanto la selezione positiva è utilizzata in questo passaggio (Figura 22b). In un secondo passaggio, un altro costrutto di sostituzione, che porta una specifica mutazione e non possiede geni marcatori viene introdotto nelle cellule staminali embrionali modificate. La ricombinazione omologa elimina entrambi i marcatori ed i cloni che posseggono la mutazione desiderata (*tk*⁻) vengono identificati per la loro resistenza all'analogo di base tossico ganciclovir o FIAU. Questa tecnica è stata applicata per diversi loci (Askev et al., 1993; Gondo et al., 1994; Stacey et al., 1994; Wu et al., 1994; Melton et al., 1994; Whyatt e Rathjen., 1997). Il suo maggior vantaggio consiste nel poter inserire consecutivamente diverse mutazioni nello stesso locus. La linea cellulare inizialmente modificata infatti può essere utilizzata come substrato per l'inserimento di nuove mutazioni nella regione circostante.

2.7 Creazione di topi “knock-in”

Una variazione al normale metodo di produzione di linee murine knock-out, consiste nell'introduzione di un gene esogeno in un locus specifico, ed è chiamato “knock-in” (Figura 23). Mediante questa tecnica si può posizionare un gene specifico, come un oncogene o un gene reporter, sotto il controllo di un elemento regolatorio di un altro gene che agisce in cis. Questo controllo era stato ottenuto mediante la creazione di transgeni. Questa tecnica presenta però considerevoli vantaggi che evitano le limitazioni imposte dalla tecnologia dei transgeni. La ricombinazione omologa permette di posizionare il gene sotto il controllo dell'intero sistema di regolazione del gene endogeno ed inoltre il transgene non è soggetto ad effetti di posizione come risultato di un sito di integrazione casuale. La più comune applicazione di questa tecnica rappresenta l'introduzione del gene *LacZ* come gene reporter in diversi loci (Le Mouellic et al., 1990; Colucci-Guyon et al., 1994). Questa metodologia inoltre si è dimostrata molto utile nello studio di relazioni funzionali tra membri di una famiglia genica e la loro potenziale abilità di compensazione (Cooke et al., 1997).

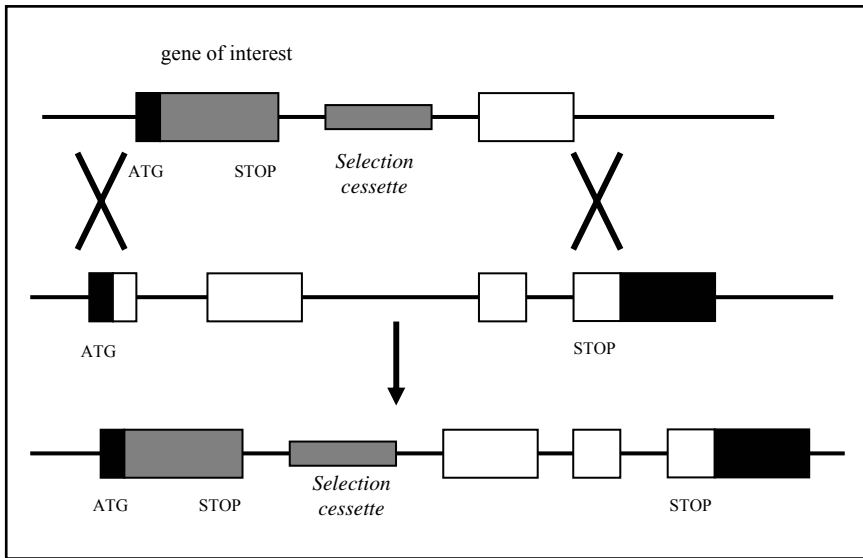


Figura 23. *Generazione di un topo knock-in.* Questa metodologia permette l'espressione di un gene di interesse sotto il controllo di uno specifico promotore. Infatti, in seguito a ricombinazione omologa, il gene di interesse (in grigio) è posizionato sotto il controllo del promotore (in nero) del gene bersaglio (in bianco), regolandone quindi la modalità di espressione.

2.8 Grandi delezioni o riarrangiamenti cromosomici: creazione di topi “knock-out” e “knock-out” condizionali

Nei successivi paragrafi verranno descritte due differenti strategie, che consentono un più ampio riarrangiamento cromosomico nei geni bersaglio.

2.8.1 Creazione di topi “knock-out”

L’inserimento di grandi delezioni, mediante ricombinazione omologa, all’interno di un gene prescelto, che ne provochino la sua inattivazione, è stata una tecnica fortemente utilizzata negli ultimi decenni per capire la funzione svolta *in vivo* da molti geni. Grandi delezioni, fino ad alcune chilobasi, di un gene possono essere realizzate attraverso l’utilizzo di vettori che contengono una regione di omologia per la ricombinazione omologa ed all’interno di questa un marker di selezione positiva (resistenza alla neomicina). Il vettore viene linearizzato in modo da utilizzare le regioni omologhe per l’appaiamento ed un doppio evento di “crossing over” determina la sostituzione della regione cromosomica prescelta con il marker di selezione positiva alterando così la struttura del gene prescelto (Figura 24). Le cellule ES in cui è avvenuto l’evento di ricombinazione sono selezionate grazie alla resistenza al marker di selezione positiva ed utilizzate per la realizzazione della chimera che dopo successivi reincroci darà origine ai topi knock-out per il gene prescelto. Tuttavia per alcuni geni l’inattivazione, dovuta alla delezione, nella linea germinale può rivelarsi letale ai primi stadi embrionali, rendendo impossibile studiare gli effetti della mutazione in stadi tardivi dello sviluppo dell’embrione o in età adulta.

2.9 Il sistema Cre/loxP

Una strategia recentemente sviluppata che utilizza il sistema Cre-*loxP* della ricombinazione sito specifica del batteriofago P1, oggi rende possibile generare mutazioni knock-out somatiche che sono tessuto specifiche ed inducibili a diversi stadi di sviluppo dell’embrione o dell’adulto (Chambers, 1994). La ricombinasi Cre (cyclization recombination) è una proteina di 38 kDa espressa dal batteriofago P1 ed appartenente alla famiglia Int delle DNA ricombinasi sito-specifiche. Essa svolge un ruolo molto importante nel risolvere i dimeri plasmidici dopo la replicazione batterica (Sauer et al.,

INTRODUZIONE

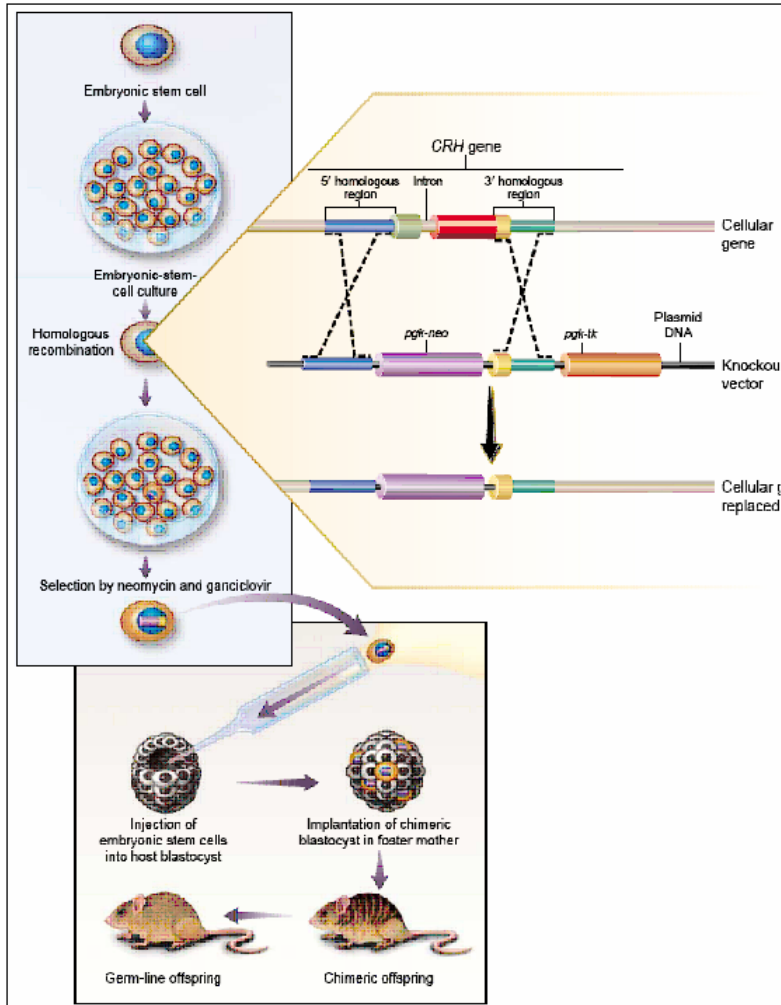


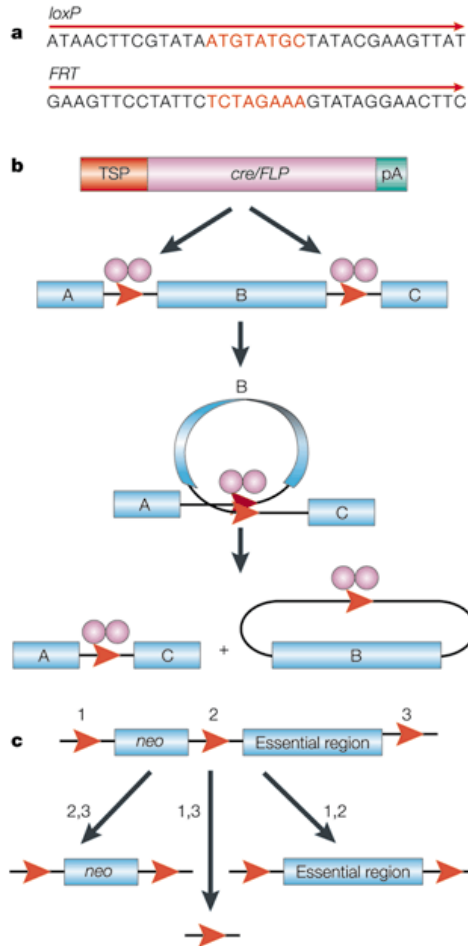
Figura 24. Creazione di topi knock-out. Le cellule staminali embrionali (ES) sono elettroporate con un vettore che contiene la regione di DNA genomico per la ricombinazione omologa (rettangolo azzurro) ed il marker di selezione positivo (*neo*; rettangolo viola). Il vettore è linearizzato in modo che dopo l'evento di ricombinazione l'inserimento della neomicina interrompa il gene bersaglio. L'evento di ricombinazione è selezionato mediante l'utilizzo del marcatore positivo (*neo^r*) ed i cloni prescelti sono iniettati negli embrioni allo stadio di blastocisti per l'ottenimento delle chimere (topo marrone/nero).

1998). Cre riconosce un sito di 34 paia di basi sul genoma di P1 denominato *loxP* (locus of X-over of P1). Il sito *loxP* è costituito da due ripetizioni invertite di 13 paia di basi più una sequenza fiancheggiante di 8 paia di basi non palindromica (Figura 25a) (Lewandoski et al., 2001). La ricombinazione mediata da Cre tra due ripetizioni dirette di siti *loxP* risulta nell'excisione del DNA compreso tra le ripetizioni come una molecola di DNA circolare, mentre la ricombinazione da parte di Cre tra due ripetizioni invertite dei siti *loxP* genera l'inversione del DNA compreso tra tali siti (Figura 25b).

2.9.1 Creazione di topi “knock-out” condizionali con il sistema Cre/*loxP*

Tale sistema è stato quindi utilizzato nei topi per creare un'inattivazione genica condizionale. Il vettore utilizzato per la ricombinazione omologa contiene all'interno di due siti *loxP* il marker di selezione positiva (la resistenza alla neomicina, neo) e attraverso l'utilizzo di un terzo sito *loxP* a valle si inserisce anche la regione di DNA genomico per la ricombinazione omologa tra due siti *loxP* (un sito è in comune con la neomicina) (Figura 25c). I siti *loxP* sono inseriti all'interno di regioni introniche per non alterare con il loro inserimento il corretto schema di lettura del gene bersaglio. Il vettore viene elettroporato in cellule ES per la ricombinazione omologa e le cellule staminali embrionali in cui ha avuto luogo la ricombinazione si mostrano resistenti alla neomicina. Utilizzando vari metodi come la PCR (Polimearse Chain Reaction) o il Southern blot è possibile caratterizzare ed identificare i cloni delle cellule staminali che portano il riarrangiamento cromosomico desiderato (Ramirez-Solis et al., 1995). Successivamente l'azione della ricombinasi Cre origina tre differenti prodotti in egual misura a seconda della coppia di siti che hanno ricombinato (Fig.25c). I cloni prescelti non sono più resistenti alla neomicina, ma presentano la regione del DNA genomico per la ricombinazione omologa tra due siti *loxP*. Questi cloni sono utilizzati poi per l'iniezione su embrioni allo stadio di blastocisti e la successiva creazione delle chimere. La chimera è poi reincrociata con topi selvatici. La progenie viene analizzata e reincrociata fino all'ottenimento di topi che presentano su entrambi gli alleli la regione genomica per la ricombinazione omologa tra i due siti *loxP*. Questi ultimi sono poi reincrociati con topi che esprimono la ricombinasi Cre in maniera tessuto-specifica in maniera da inattivare, mediante la ricombinazione, l'espressione del gene d'interesse solo nei tessuti in cui esso è espresso e non in altri (Figura 26).

INTRODUZIONE



Nature Reviews | Genetics

Figura 25. Controllo dell'espressione genica mediante ricombinazione mediata dalla ricombinasi Cre. (a) Sequenza dei siti *loxP* o degli omologhi siti *FRT*. (b) Ripetizioni dirette dei siti *loxP* consentono di eliminare le regioni di DNA comprese fra questi sotto l'azione della ricombinasi Cre che può essere espressa anche in maniera tessuto-specifica (TSP). (c) L'utilizzo di tre siti *loxP*, collocati tra il marker di selezione positiva (neomocina) e la regione del gene che si vuole interrompere, consente di ottenere differenti prodotti di ricombinazione a secondo di quali siano i siti coinvolti

INTRODUZIONE

Questo metodo consente così di inattivare selettivamente l'espressione del gene d'interesse e di analizzarne il fenotipo ottenuto (Lewandoski et al., 2001; Yu et al., 2001).

INTRODUZIONE

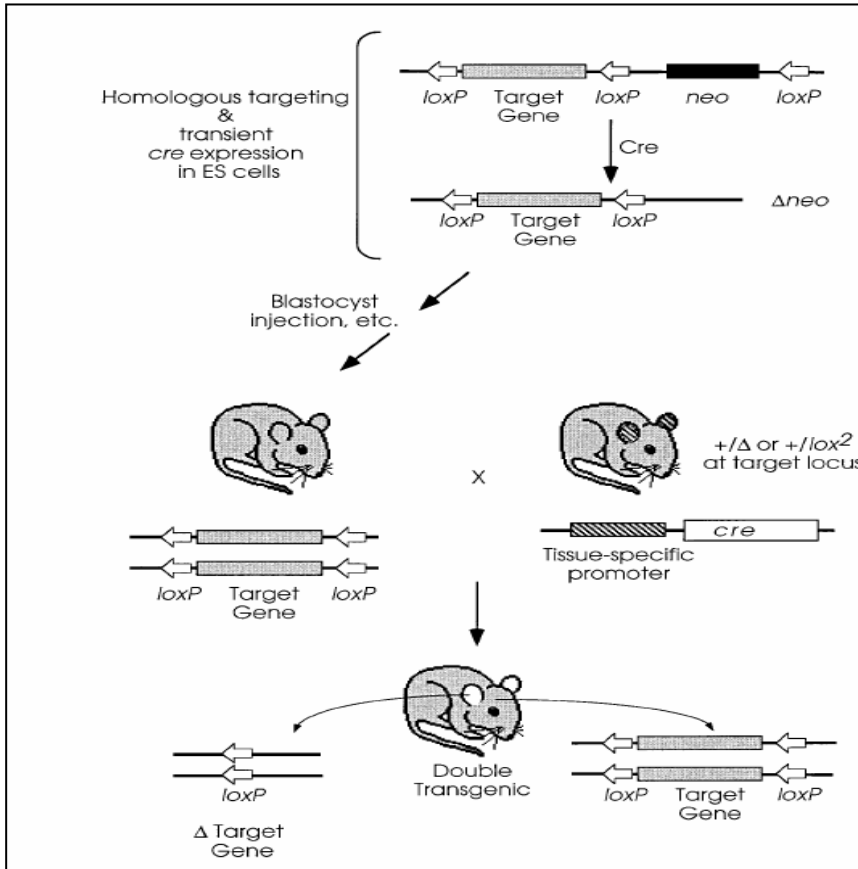


Figura 26. Ablazione genica condizionale mediata dalla ricombinasi Cre. Il gene target è posto tra due ripetizioni dirette del sito *loxP*. La cassetta della neomicina viene posta anch'essa tra i siti *loxP* per essere poi successivamente eliminata dopo l'elettroporazione e la selezione dei cloni ES. Dopo l'iniezione del clone in un embrione allo stadio di blastocisti si ottengono le chimere. Queste sono successivamente reincrociate fino all'ottenimento di linee dove entrambi gli alleli del gene bersaglio sono posti tra i siti *loxP*. L'incrocio di questa linee con topi che esprimono la ricombinasi Cre in maniera tessuto-specifica consente di ottenere topi in cui si interrompe l'espressione del gene d'interesse solo nei tessuti prescelti.

3.1 Il differenziamento epidermico: un esempio di morte cellulare programmata

Durante il differenziamento epidermico, precedentemente descritto, è possibile osservare come i futuri cheratinociti diventino metabolicamente inattivi con conseguente degradazione degli organelli intracellulari. Al termine del differenziamento le cellule così modificate non sono però eliminate ma diventano una sorta di “contenitori” costituiti per circa 80% da cheratine ed altre proteine dell’involucro corneo. Durante l’assemblamento della barriera epidermica la membrana plasmatica si fonde poi alle membrane dei corpi lamellari, contenenti lipidi, con conseguente formazione di una barriera contro la perdita di acqua. Il differenziamento epidermico rappresenta quindi un esempio di morte cellulare con numerose analogie (programma geneticamente definito) ma anche sostanziali differenze (la cellula in differenziamento non viene ad esempio eliminata dai macrofagi) con un altro processo di morte cellulare: l’apoptosi.

3.2 L’apoptosi

Negli organismi multicellulari l’apoptosi o morte cellulare programmata è una condizione fisiologica che normalmente garantisce un bilancio omeostatico tra la proliferazione cellulare ed il ricambio (turnover) in quasi tutti i tessuti. L’apoptosi è responsabile della rimozione delle cellule generate in eccesso, che hanno concluso le loro specifiche funzioni o che sono dannose per l’organismo. Questo processo diventa particolarmente importante durante lo sviluppo embrionale, il rinnovamento tissutale e in numerose condizioni patologiche (Thompson et al., 1995). I principali cambiamenti nella cellula che sta andando incontro ad apoptosi sono la diminuzione del volume cellulare, la formazione di vescicole, da parte della membrana (“blebbing”), taglio del DNA cromosomale nei siti internucleosomali e frammentazione del DNA. La conseguenza del “blebbing” della membrana cellulare è il rilascio dei corpi apoptotici legati alla membrana. La fosfatidilserina, che è normalmente localizzata nella faccia più interna della membrana plasmatica diventa esposta sulla faccia più esterna facendo così da segnale per la fagocitosi mediata dai macrofagi. In questo modo l’apoptosi garantisce una rapida ed efficiente rimozione delle cellule (Kerr et al., 1972). I meccanismi coinvolti nell’apoptosi non sono ancora completamente compresi, tuttavia una componente chiave è

l'attivazione delle caspasi, una famiglia di proteasi che partecipa ad una cascata di eventi che terminano con il disassemblamento delle cellule (Thornberry et al., 1998). Sebbene la cascata proteolitica attivata dalle caspasi rappresenti un punto centrale nella risposta apoptotica, la sua attivazione è strettamente e finemente regolata da altri fattori. La famiglia delle proteine Bcl-2 gioca un ruolo fondamentale nell'attivazione delle caspasi stesse.

3.3 La famiglia di proteine Bcl-2

Le proteine della famiglia Bcl-2 sono un'ampia proteine estremamente rilevanti per la regolazione dell'apoptosi. Il gene *Bcl-2* è stato originariamente clonato dal punto di rottura t(14;18) dei linfomi a cellule B da Carlo Croce e Yoshida Tsujimoto. La traslocazione di tale gene è infatti responsabile della trasformazione neoplastica delle cellule stesse. Successivamente David Vaux e Stan Korsmeyer scoprirono indipendentemente che Bcl-2 blocca l'apoptosi. Attualmente sono state identificate numerose proteine simili che quindi costituiscono una famiglia di proteine con azione sia antagonista che agonista dell'apoptosi. Molti membri della famiglia Bcl-2 hanno un dominio idrofobico al C-terminale che permette l'inserzione della proteina nella faccia citosolica delle membrane intracellulari, essenziale per la loro funzione (Nguyen et al., 1993). Questa famiglia include proteine che possono promuovere la sopravvivenza cellulare, come Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-W o la morte cellulare come Bax, Bak, Bcl-X_s, Bok (Figura 27). Le quantità relative o l'equilibrio tra queste proteine pro- e anti-apoptotiche influenza la suscettibilità delle cellule al segnale di morte. Il dominio BH3 è presunto essere un "dominio della morte" nei membri pro-apoptotici. Questo concetto è supportato dai membri che contengono solo il dominio BH3, i quali risultano essere tutti pro-apoptotici. (Puthakakath et al., 2002) (Fig.27) (Burlacu et al., 2003).

3.4 Le caspasi

Le caspasi sono proteasi a cisteina con specificità per i residui di aspartato, che quando sono attivate tagliano specifici substrati attivandoli o inattivandoli (Green et al., 2003). Nei mammiferi sono state identificate

INTRODUZIONE

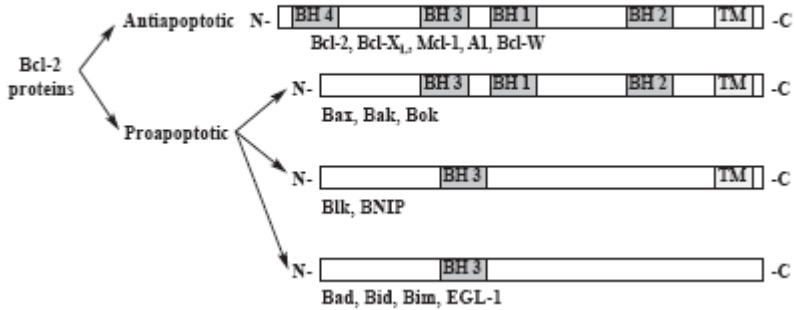


Figura 27. Rappresentazione schematica dei membri della famiglia di Bcl-2. Le proteine sono rappresentate in maniera lineare. BH1-4 rappresentano i domini omologhi, mentre TM è il dominio carbossiterminale transmembrana. La famiglia Bcl-2 comprende: proteine anti-apoptotiche (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-W) con tutti e quattro i domini BH e TM, Le proteine pro-apoptotiche (Bax, Bak, Bok) presentano i domini BH1-3 ma non BH-4 insieme al dominio TM. I ligandi pro-apoptotici (Blk, BNIP) presentano invece solo il dominio BH3 più il TM, mentre altre contengono solo il dominio BH3 (Bad, Bid, Bim ed EGL-1).

almeno 14 differenti caspasi (Zhaoyu et al., 2005). Queste ultime sono poi classificate in due differenti categorie in base alla loro funzione. Le caspasi esecutrici (caspasi-3, -6 e 7 nei vertebrati) sono inattive come dimeri e risiedono nel citosol della cellula. Esse sono attivate mediante taglio in siti specifici tra quelle che saranno la grande e la piccola subunità nell'enzima maturo con conseguente induzione della morte cellulare (Boatright et al., 2003). L'altra classe comprende gli enzimi responsabili dell'attivazione delle caspasi esecutrici :le caspasi iniziatrici. Queste ultime (caspasi-8, -9 e -10) non sono attivate da taglio, ma esistono come monomeri la cui dimerizzazione ne determina l'attivazione. Ciò avviene infatti quando molecole adattatrici si legano al dominio di interazione delle proteine localizzato nel prodominio all'N-terminale della caspasi iniziatrice (Boatright et al., 2003). Tali prodomini sono invece assenti nelle caspasi esecutrici. La caspasi iniziatrice e le differenti molecole adattatrici che le legano definiscono due differenti vie per l'attivazione della morte cellulare programmata.

3.5 La via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi

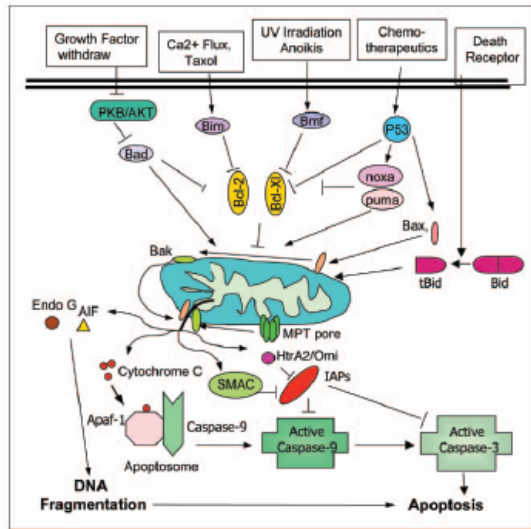
Nei vertebrati esistono due vie di morte cellulare programmata: la prima e mediata dal mitocondrio (via intrinseca dell'apoptosi), mentre la seconda è mediata dai recettori di morte cellulare (via estrinseca dell'apoptosi).

3.5.1 La via intrinseca dell'apoptosi

La via mitocondriale, attivata da chemioterapici, radiazioni UV etc., rappresenta un altro meccanismo ben caratterizzato di attivazione delle caspasi iniziatrici. In questo caso la caspasi iniziatrice-9 dopo essere stata attivata, attraverso il dominio di attivazione CARD (Death Fold Caspase Recruitment Domain), si lega al CARD della molecola apoptotica adattatrice Apaf-1 (Protease Activating Factor-1). Quest'ultima esiste in forma monometrica nel citosol di cellule vitali, ma quando è attivata forma un oligomero (l'apoptosoma) ed espone il suo dominio CARD. La caspasi-9 lo lega ed è successivamente attivata mediante la sua dimerizzazione (Figura 28a). L'attivazione delle caspasi effettrici ovviamente induce la morte cellulare. L'unico attivatore di APAF-1 è il citocromo c. Quest'ultimo fuoriesce infatti dal mitocondrio, in seguito a permeabilizzazione della

INTRODUZIONE

A



B

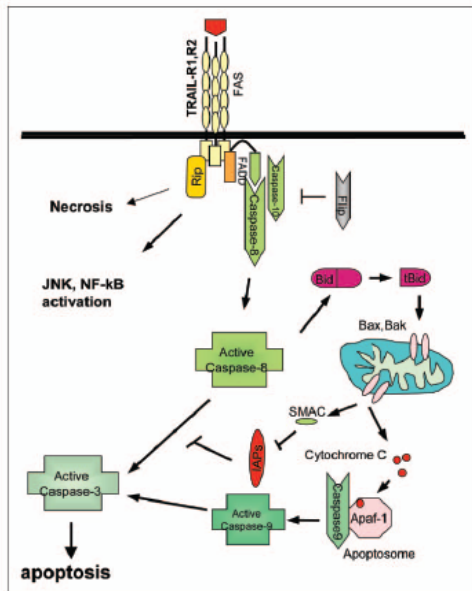


Figura 28. Via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi. (dettagli nel testo).

membrana più esterna mitocondriale e si lega successivamente ad APAF-1 con conseguente attivazione di quest'ultimo. La permeabilizzazione della membrana mitocondriale è regolata dalla famiglia Bcl-2. I membri anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-X_L, A1, Bcl-W) ne prevengono infatti la depolarizzazione, mentre contrariamente i membri pro-apoptotici (Bax, Bak e Bok) (Wei et al., 2001) favoriscono il rilascio del citocromo c. Quest'ultimo è infatti una molecola di notevole importanza sia per la vita della cellula (trasporto degli elettroni nei mitocondri per la formazione di ATP), sia per la sua morte (segnale mitocondriale di attivazione dell'apoptosoma).

3.5.2 La via estrinseca

La via estrinseca dell'apoptosi è attivata mediante il legame di ligandi ai recettori di morte cellulare (TNF-TNFR1, Fas-FasL e TRAIL-DR4). La famiglia TNF (Tumor Necrosis Factor) di recettori (TNFR) è caratterizzata dalla presenza di domini ricchi in cisterna (CRDs) che mediano il legame dei loro ligandi a questi recettori transmembrana. Quest'ultima, contrariamente a Fas e TRAIL, non induce morte cellulare spontaneamente, poiché è in grado di attivare la via di NF- κ B che attiva una serie di fattori anti-apoptotici (IAPs). La via mediata dai recettori TNF è in grado inoltre di legarsi indirettamente alla proteina adattatrice contenente il dominio di morte FADD (Fas-associated Death Domain) con conseguente attivazione della caspasi iniziatrice 8. Fas e TRAIL sono invece in grado di formare il complesso di morte DISC (Death Inducing Signalling Complex). Dopo il legame con il ligando il recettore trimerizza. La molecola adattatrice FADD, contenente un dominio effettore di morte (DED) lega la pro-caspasi-8 al complesso recettore-ligando. Successivamente quest'ultima viene processata con conseguente attivazione degli altri membri della famiglia delle caspasi tra cui quella effettrice (caspasi-3). In alcuni tipi cellulari avviene un'amplificazione del segnale mediato da Fas con conseguente attivazione della caspasi-8 e di Bid. Quest'ultimo dopo taglio viene rilasciato dal mitocondrio con conseguente liberazione di fattori pro-apoptotici come SMAC/Diablo o del citocromo c. Il citocromo c media poi l'attivazione della caspasi-9 e la formazione dell'apoptosoma (Figura 28b). Tale via rappresenta un punto d'incontro tra le due differenti vie apoptotiche.

3.6 Il gene *p63*: dalla morte cellulare programmata al differenziamento epidermico

3.6.1 La funzione di *p63* come fattore di trascrizione

Il gene *p63* (TP63) fu clonato indipendentemente da diversi gruppi nel 1998 ed identificato come uno dei membri della famiglia di fattori trascrizionali di *p53* (Augustin et al., 1998; Yang et al., 1998; Osada et al., 1998).

p53 è un oncosoppressore inattivato nella maggior parte dei tumori umani. In risposta al danno al DNA o ad altri stress, *p53* viene stabilizzato ed agisce come fattore trascrizionale sequenza specifico, attivando l'espressione di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, nel riparo del DNA e nei processi di morte cellulare. Questa specificità di funzione è mediata dal dominio di legame al DNA, che permette a *p53* di legarsi esclusivamente ai promotori contenenti due o più ripetizioni in tandem della sequenza consenso RRRCWWGYYY (Kern et al., 1991; el-Deiry et al., 1992). In questo modo l'attività di *p53* garantisce l'integrità del genoma, evita che cellule potenzialmente mutate possano proliferare ed infine, determina la morte di quelle cellule irrimediabilmente danneggiate che rappresenterebbero una potenziale minaccia per l'organismo (Vogelstein et al., 2000). *p63*, insieme a *p73*, clonato a sua volta nel 1997, è un omologo di *p53*. *p63* è in grado di legarsi ad una sequenza consenso canonica di *p53*. Questa sua proprietà è stata riscontrata sia sulla proteina espressa esogenamente che a livello della proteina endogena nei cheratinociti (Westfall et al., 2003). Comunque, il differente ruolo funzionale delle due proteine, implica che esse possano regolare l'espressione di geni diversi, pur utilizzando lo stesso sito di legame al DNA. Questo "apparente" paradosso è stato recentemente risolto dalla constatazione che *p63* lega una sequenza consenso leggermente diversa rispetto a quella canonica riconosciuta da *p53* con maggiore affinità rispetto a quest'ultima. Infatti, mentre la sequenza canonica per *p53* è RRRCATGYYY, *p63* lega preferenzialmente la sequenza tipo RRRCGTGYYY (R = nucleotide purinico, Y = nucleotide pirimidinico, W = qualunque nucleotide), presente in alcuni promotori regolati esclusivamente da *p63* e non da *p53*, come il promotore del gene della envoplachina (Osada et al., 2005).

3.6.2 p63: il gene e la struttura proteica

Il gene TP63 umano, codificanti le diverse isoforme della proteina p63, risiede sul cromosoma 3 e si compone di 15 esoni che occupano circa 220 kB. p63 può essere espresso utilizzando due diversi promotori, uno situato subito a monte del primo esone ed un secondo localizzato nel terzo introne. La trascrizione dal primo o dal secondo esone dà origine rispettivamente ad una isoforma TAp63 o Δ Np63. Entrambe queste due isoforme subiscono uno splicing alternativo al carbossi-terminale del trascritto primario che risulta nelle sintesi di tre ulteriori isoforme: α , β , γ (Figura 29).

Tutte le isoforme in questione contengono un dominio di legame al DNA, altamente omologo a quello di p53 (circa il 60% dei residui aminoacidi risulta essere conservato) ed un dominio di oligomerizzazione omologo al 37% a quello di p53. Inoltre TAp63 possiede all' N-terminale un dominio acido di transattivazione omologo, naturalmente, a quello di p53 (circa il 22% dei residui risulta conservato), dominio che non è codificato dal trascritto di Δ Np63, a causa della mancanza dei primi due esoni. Lo splicing differenziale del carbossi-terminale introduce un ulteriore livello di complessità, portando alla formazione di tre ulteriori isoforme. L'isoforma α , la più lunga, contiene un dominio Sterile alpha-motif (SAM), motivo coinvolto nelle interazioni proteina-proteina (Schultz et al., 1997). Questo dominio è assente nelle altre due isoforme beta e gamma, che sono più brevi della isoforma α (Fig. 29).

I primi esperimenti di transattivazione hanno evidenziato la capacità di TAp63 di transattivare geni contenenti un sito di legame per p53 (Yang et al, 98, Osada et al, 98), mentre Δ Np63 si è dimostrato capace di agire come dominante negativo, reprimendo l'attività trascrizionale dei membri della famiglia di p53. Il legame delle isoforme TAp63 ai siti di legame per p53 è infatti in grado di indurre, in omologia con p53, l'arresto del ciclo cellulare o morte cellulare programmata (mitocondrio-dipendente o -indipendente) (Gressner O. et al., 2005). In effetti i domini di legame di p53 e p63 sono altamente omologi e tutti i residui che svolgono un ruolo critico nell'interazione con il DNA sono perfettamente conservati tra le due proteine. Naturalmente questa non comporta solamente un'omologia della sequenza primaria, ma soprattutto una stretta omologia nel ripiegamento della struttura terziaria. Studi di risonanza magnetica dei domini di p53 e p63 hanno dimostrato un elevato livello di conservazione e della struttura secondaria e della struttura terziaria delle due proteine (Furrer et al., 2003).

INTRODUZIONE

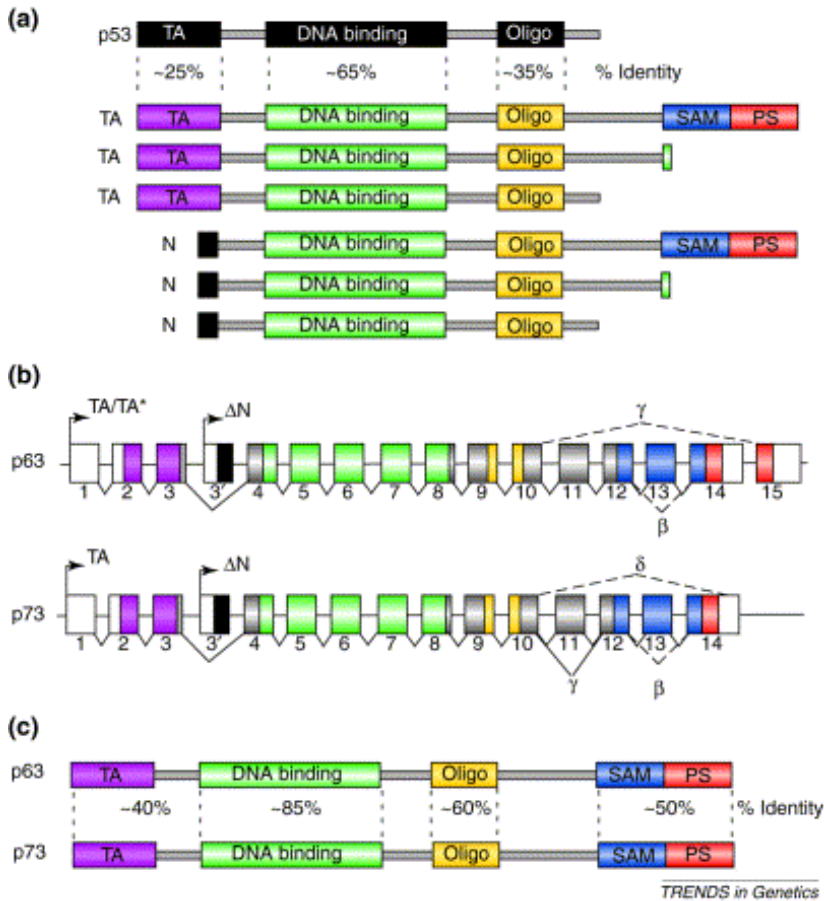


Figura 29. Struttura genica dei membri della famiglia di p53. (a) Confronto tra i domini di p53 e le sei maggiori isoforme codificate da p63 e p73. TA ,dominio di trans-attivazione, ;Oligo,dominio di oligomerizzazione; SAM ,motivo alpha sterile, implicato nell'interazione proteina-proteina; PS, dominio post-SAM implicato nella repressione trascrizionale; le isoforme ΔN mancanti del dominio di trans-attivazione all'N-terminale sono trascritte dal promotore intronico sia in p63 che in p73. (b) Organizzazione genica di p63 e p73. Il promotore prossimale origina le isoforme TA/TA* (TA* è un'isoforma contenente 39 amino acidi in più all'N-terminale rispetto a TA), mentre dal promotore distale prendono origine le isoforme ΔN. Lo splicing alternativo al C-terminale origina invece le varianti di splicing α β, γ ed in p73 anche le isoforme δ. (c) p63 e p73 presentano una elevata omologia di sequenza.

E' questa omologia che rende possibile a p63 il legame con la sequenza consensus di p53 (Westfall et al., 2003; Flores et al., 2002) e di conseguenza l'attivazione di geni che mediano l'arresto del ciclo cellulare (apoptosi).

3.6.3 La funzione di p63 negli epiteli: i modelli animali

Lo sviluppo di modelli animali knock-out ha fornito un chiarimento determinante della funzione di p63. Questi animali hanno degli evidenti difetti di sviluppo, che comprendono una pressoché completa assenza di epiteli squamosi pluristratificati, tra cui, cosa rimarchevole, la pelle, e dei loro annessi, inclusi ghiandole salivari, mammarie e lacrimali. A causa della mancanza di una barriera epidermica, questi animali muoiono a poche ore dalla nascita per disidratazione (Yang et al., 1999; Mills et al, 1999) (Figura 30). Inoltre altri difetti tipici dei topi nulli per p63, sono l'assenza di arti e difetti dello sviluppo craniofacciale, come palatoschisi e assenza di denti. Il mancato sviluppo degli arti è correlato alla incapacità degli embrioni knock-out di sviluppare e/o differenziare correttamente la cresta apicale ectodermica, la regione distale di ciascun arto, contenente le cellule staminali, responsabili dell'accrescimento dell'organo (Yang et al., 1999; Mills et al, 1999).

A testimonianza dell'alto livello di conservazione filogenetica dei membri della famiglia di p63, l'ablazione dell'espressione della detta proteina in zebrafish, risulta in un fenotipo del tutto sovrapponibile a quello caratterizzato nel topo, con l'assenza di morfogenesi degli epiteli e delle pinne (Lee et al., 2002; Bakkers et al., 2002). Di estremo interesse è il fatto che nello zebrafish non è stata isolata alcuna forma TA di p63, per cui il fenotipo del knock-out è interamente dovuto alla eliminazione della espressione di $\Delta Np63$.

3.6.4 Le ipotesi sulla funzione di p63 e delle sue isoforme durante lo sviluppo epiteliale

Il fenotipo dei modelli murini kb knock-out per p63, ha portato alla formulazione di due diverse ipotesi relative al ruolo della proteina nello sviluppo degli epiteli. Un' ipotesi (Yang et al., 1999) stabilisce che p63, in particolare l'isoforma ΔN , è importante per la proliferazione delle cellule

INTRODUZIONE

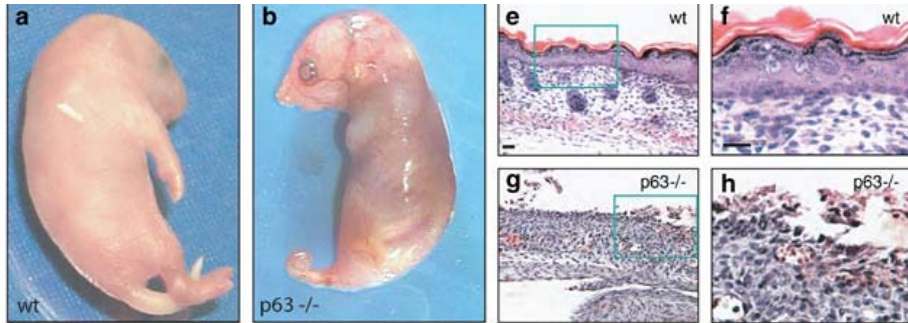


Figura 30. Fenotipo dei topi *p63*^{-/-}. (a) Confronto tra topi selvatici (wild type) e topi *p63*^{-/-} (b). Questi ultimi presentano anomalie agli arti ma è inoltre evidente la mancata formazione dell'epidermide. Ematossilina-eosina su sezioni di pelle murina selvatica (e,f) e *p63*^{-/-} (g,h). Quest'ultima manca di epidermide, mentre si può osservare il sottostante derma. Nei topi knock-out sono inoltre assenti gli arti e gli annessi cutanei.

progenitrici degli epiteli, per cui l'assenza di pelle nel knock-out, si spiegherebbe con la perdita di proliferazione dei cheratinociti dello strato basale. Un'interpretazione pressoché opposta, vede in p63 il determinante della specificazione e del differenziamento degli epiteli squamosi (Mills et al., 1999). Esistono prove sperimentali a sostegno di entrambe le ipotesi.

Ad esempio, a favore di un ruolo proliferante di $\Delta Np63\alpha$ è la sua espressione selettiva nelle cellule proliferanti dello strato basale ed è la sua rapida degradazione nei cheratinociti indotti a differenziare *in vitro* (Yang et al., 1998; Pellegrini et al., 2001; Bamberger et al., 2002; Westfall et al., 2003). Per di più, l'espressione esogena di $\Delta Np63$ nei cheratinociti ne blocca i processi di differenziamento, processi alla cui base è un blocco irreversibile del ciclo cellulare (King et al., 2003). Inoltre, la degradazione della proteina è richiesta perché i processi di arresto proliferativo ed apoptosi nei cheratinociti esposti agli UV abbiano luogo. Anche i dati ottenuti in zebrafish sembrano sostenere un ruolo chiave di $\Delta Np63\alpha$ nella proliferazione delle cellule epiteliali (Lee et al., 2002).

Nel 2004 un lavoro di forte impatto (Koster et al., 2004) ha dato sostegno all'ipotesi di un ruolo di p63 nella specificazione degli epiteli pluristratificati. In particolare gli autori dimostrano che l'espressione esogena *in vivo* di TAp63 α è in grado di indurre pluristratificazione in un epitelio tipicamente monostratificato come quello bronchiale. Inoltre, essi riscontrano un'inibizione del differenziamento della pelle in condizioni di overespressione di TAp63 α , testimoniato da un ritardo nell'espressione di marcatori del differenziamento della pelle (come cheratina 10) e da una proliferazione anomala delle cellule dello strato sovrabasale. Gli autori, analizzano anche i tempi di espressione delle isoforme di p63 durante lo sviluppo embrionale del topo, constatando che l'isoforma TA è espressa al giorno 7.5 di gestazione, prima delle isoforme TA che risulta espressa invece a partire dal giorno 9.5. In conclusione Koster et al., sostengono che TAp63 α abbia la funzione di specificare la pluristratificazione degli epiteli e che la successiva espressione di $\Delta Np63$ si renda necessaria per inibire l'azione di TA e permettere il differenziamento cheratinocitario.

3.7 Risposta cellulare allo stress: un problema di vita o di morte

3.7.1 Il reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico è la sede della sintesi e ripiegamento (“folding”) delle proteine secrete, di membrana e di quelle indirizzate negli organelli (Ma et al., 2004) (Figura 31) Alcuni fattori sono richiesti per il corretto ripiegamento delle proteine come l’ATP, il Ca^{++} ed un ambiente ossidante per garantire la formazione dei ponti disolfuro (Szegezdi et al., 2006; Gaut e Hendershot, 1993).

Come conseguenza di questo ambiente “specializzato” il reticolo endoplasmatico (RE) risulta essere altamente sensibile a segnali (stress) che perturbano il livello di energia all’interno della cellula o ai cambiamenti dello stato redox ed infine alla concentrazione di Ca^{++} intracellulare. L’aggregazione delle proteine è tossica per le cellule e pertanto numerose condizioni patofisiologiche sono associate allo stress del reticolo endoplasmatico inclusa l’ischemia, le malattie neurodegenerative ed il diabete (Kaufman et al., 2002). La maturazione delle proteine nascenti nel reticolo endoplasmatico è monitorata da “chaperones molecolari” e dagli enzimi che assistono il ripiegamento (“folding”) che si associano alle proteine neosintetizzate in modo da prevenirne l’aggregazione e aiutarne il corretto ripiegamento. Le proteine che non maturano correttamente poi sono trattenute nel reticolo endoplasmatico e successivamente traslocate nel citosol per la degradazione da parte del proteosoma (Ma et al., 2004) (Fig. 31).

3.7.2 Stress del reticolo endoplasmatico ed apoptosi

La risposta allo stress del reticolo (Endoplasmic Reticulum Stress Response) agisce ristabilendo la normale omeostasi del reticolo endoplasmatico ed è inoltre citoprotettiva. Tuttavia quando la situazione di “stress” è forte o persistente le cellule possono dare inizio all’apoptosi, che determina la distruzione delle cellule seriamente compromesse per la salvaguardia dell’intero organismo.

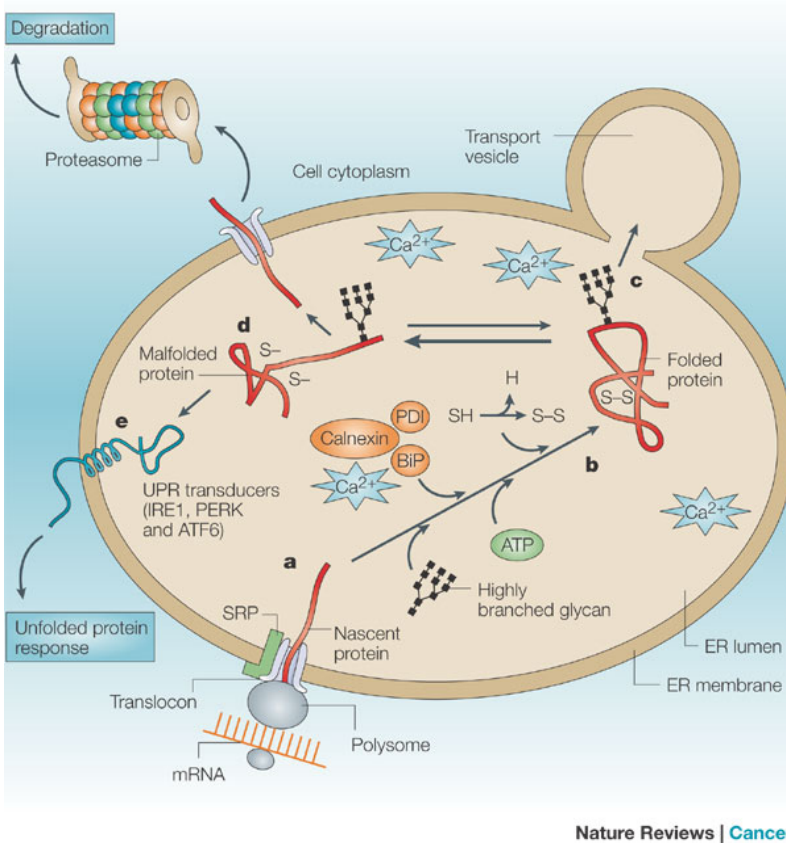


Figura 31. Struttura del reticolo endoplasmatico. (a) Le proteine della via secretoria raggiungono il lume del reticolo endoplasmatico attraverso canali localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmatico. (b,c) “Chaperones” come Bip, la calnexina e l’isomerasi PDI (protein disulphide isomerase) assistono il corretto ripiegamento delle proteine nascenti, che successivamente lasceranno il reticolo endoplasmatico raggiungendo le destinazioni finali. (d) Le proteine non correttamente ripiegate o modificate sono degradate dal proteosoma. (e) Cambiamenti delle normali condizioni all’interno del reticolo endoplasmatico originano la risposta allo stress del reticolo endoplasmatico attraverso l’attivazione dei tre principali sensori di “stress”: IRE1, PERK ed ATF6.

3.7.3 Fase I: attivazione dei sensori di stress cellulare

Esistono tre principali sensori dello stress indotto dal reticolo endoplasmatico: PERK (RNA-activated protein kinase-like ER kinase), IRE1 α/β (the inositol-requiring enzyme 1) e ATF6 (activating transcription factor 6). Tra queste proteine transmembrana residenti nel reticolo endoplasmatico IRE1 α/β e ATF6 svolgono un ruolo determinante nel mediare la regolazione trascrizionale, mentre PERK è il principale responsabile della repressione totale della sintesi proteica (Boelens et al., 2007)

PERK

La dissociazione di GRP78 (chaperone localizzato nel reticolo endoplasmatico) mediata da PERK induce dimerizzazione ed autofosforilazione della chinasi con la sua conseguente attivazione. PERK attiva è poi in grado di fosforilare il fattore d'inizio eucariotico numero 2 (eIF2), determinando così l'inibizione generale della traduzione proteica (Szegezdi et al., 2006). Questo evento favorisce la sopravvivenza cellulare inibendo il carico delle proteine nascenti che arrivano nel reticolo endoplasmatico. La fosforilazione di eIF2 regola inoltre positivamente la trascrizione di *ATF4*, che codifica per un fattore di trascrizione contenente un elemento di risposta all'AMP ciclico (C/EBP). ATF4 presenta un dualismo d'azione. Essa può infatti promuovere la sopravvivenza cellulare mediante l'induzione di geni coinvolti nel metabolismo aminoacidico, nelle reazioni redox e nella risposta a stress, oppure può attivare CHOP, fattore che verrà descritto successivamente come promotore della morte cellulare (Figura 32).

ATF6

Dopo la dissociazione di GRP78, ATF6 transloca nell'area del Golgi dove viene tagliata ed attivata mediante una limitata proteolisi. La forma attiva migra successivamente nel nucleo ed induce quei geni che nel loro promotore presentano un sito di risposta allo stress del reticolo endoplasmatico (ERSE: endoplasmic reticulum stress response element) (Schroeder and Kaufman, 2005). I target di ATF6 sono "chaperones" del reticolo endoplasmatico, CHOP e XBP1 (X box-binding protein 1).

INTRODUZIONE

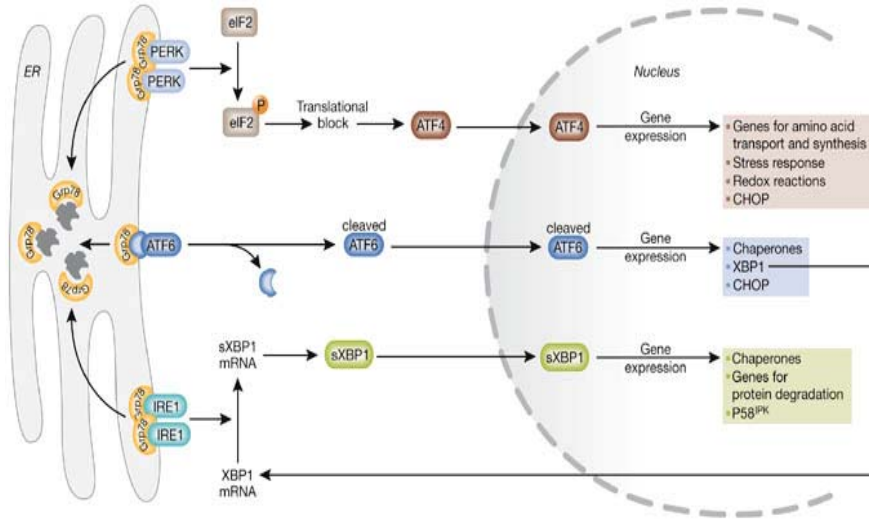


Figura 32. *La risposta allo stress mediata dal reticolo endoplasmatico (ER).*

La proteina GRP78 si dissocia dai tre recettori di stress (ATF6, PERK ed IRE1) attivandoli. PERK è il primo ad essere attivato seguito da ATF6, mentre IRE1 è attivato solo successivamente. ATF4 ed ATF6 mediano inoltre la trascrizione di CHOP, mentre IRE1 taglia XBP1 (sXBP1) che trasloca nel nucleo attivando la trascrizione di “chaperones” e di P58^{IPK} con la finalità di recuperare la funzionalità del reticolo endoplasmatico.

Quest'ultima è inoltre molto importante nella cascata di eventi indotti da IRE1 e sarà descritta successivamente.

IRE1 α/β

IRE1 è una glicoproteina transmembrana localizzata nel reticolo endoplasmatico, che presenta due isoforme: IRE1 α ed IRE1 β . IRE1 è composta da un dominio N-terminale che funge da sensore nella zona luminale del reticolo endoplasmatico, un dominio citosolico con attività di serina/treonina chinasi ed un dominio C-terminale con attività di endoribonucleasi (Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998). L'attività endonucleasica rimuove un introne di 26 paia di basi dal messaggero di XBP1, precedentemente indotta da ATF6. Questa variante di splicing (sXBP1) codifica per un fattore di trascrizione (Yoshida et al., 2001). sXBP1 attiva "chaperones" del reticolo endoplasmatico, e P58^{IPK}. Quest'ultima lega ed inibisce PERK, rimuovendo il blocco traduzionale indotto da quest'ultima (Yan et al., 2002). A questo punto se la risposta mediata dal reticolo endoplasmatico è stata sufficiente ad eliminare la condizione di stress la cellula sopravvive riprendendo le sue normali attività, mentre se la condizione di stress persiste P58^{IPK} può indurre la sintesi di proteine pro-apoptotiche (Ladiges et al., 2005). IRE1 può infine reclutare la molecola adattatrice TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) che causa come evento finale l'attivazione della caspasi-12 e conseguente attivazione dell'apoptosi (Szegezdi et al., 2006)

3.7.4 Fase II: commissionamento dell'apoptosi indotta da stress del reticolo endoplasmatico

L'attivazione di PERK, ATF6 e IRE1 può indurre l'attivazione dei segnali pro-apoptotici in condizioni di stress prolungato, ma non può causare direttamente morte cellulare. Il commissionamento di quest'ultima è infatti mediato dall'attivazione di CHOP, JNK e della famiglia di proteine Bcl-2 in grado di realizzare la fase finale esecutrice dell'apoptosi.

CHOP

CHOP è anche conosciuto come GADD153 (Growth-Arrest and DNA damage inducible gene 153), precedentemente isolato come gene attivato in risposta a danno del DNA. Quest'ultimo è un fattore di trascrizione, che presenta come motivo legame al DNA la cerniera basica di leucina ed appartiene alla famiglia C/EBP dei fattori di trascrizione (Vinson et al., 1993). E' attivato sia trascrizionalmente da ATF4 e da PERK-eIF2 che post-trascrizionalmente grazie alla fosforilazione sulla Ser78 ed Ser81 mediata dalla p38MAP-chinasi, che ne aumenta la sua attività. Il ruolo svolto da GADD153 durante la risposta allo stress del reticolo endoplasmatico è stata messa in luce mediante la creazione di topi *Chop*^{-/-}. Questi ultimi nascono alla frequenza attesa e sono fenotipicamente normali. Tuttavia lo studio sui fibroblasti murini *Chop*^{-/-} ha messo in evidenza come l'assenza di CHOP induca una parziale resistenza all'apoptosi mediata dal reticolo endoplasmatico (Zinszner et al., 1998), mentre studi nelle cellule epiteliali mammarie hanno dimostrato l'aumento dell'espressione di questo gene in risposta al differenziamento (Talukder et al., 2002). GADD153 è sostanzialmente in grado di trasformare i segnali di stress provenienti dal reticolo endoplasmatico in cambiamenti nella trascrizione genica. CHOP reprime infatti l'espressione del gene anti-apoptotico *Bcl-2* (Szegezdi et al., 2006) e attiva GADD34 (protein phosphatase PP1-interacting protein) (Figura 33). L'espressione di *Bcl-2* è a sua volta negativamente regolata da JNK (c-Jun-N-terminal kinase), che fosforilando *Bcl-2* ne determina l'incapacità a sequestrare le proteine pro-apoptotiche con dominio BH3 (Bassik et al., 2004). Tra queste troviamo Bax e Bak, che sono importanti nel regolare il livello del Ca⁺⁺ intracellulare attraverso l'interazione con il recettore dell'inositolo trifosfato (IP3) (Nutt et al., 2002; Oakes et al., 2005; Scorrano et al., 2003; Boyce e Yuan., 2006). GADD34 defosforila invece eIF2 α rimuovendo così il blocco trascrizionale (Brush et al., 2003). L'espressione ectopica di GADD34 è in grado di iniziare l'apoptosi (Adler et al., 1999), ma il meccanismo attraverso cui la induca non è ancora del tutto chiaro. E' probabile che la rimozione del blocco trascrizionale determini la sintesi delle proteine pro-apoptotiche.

INTRODUZIONE

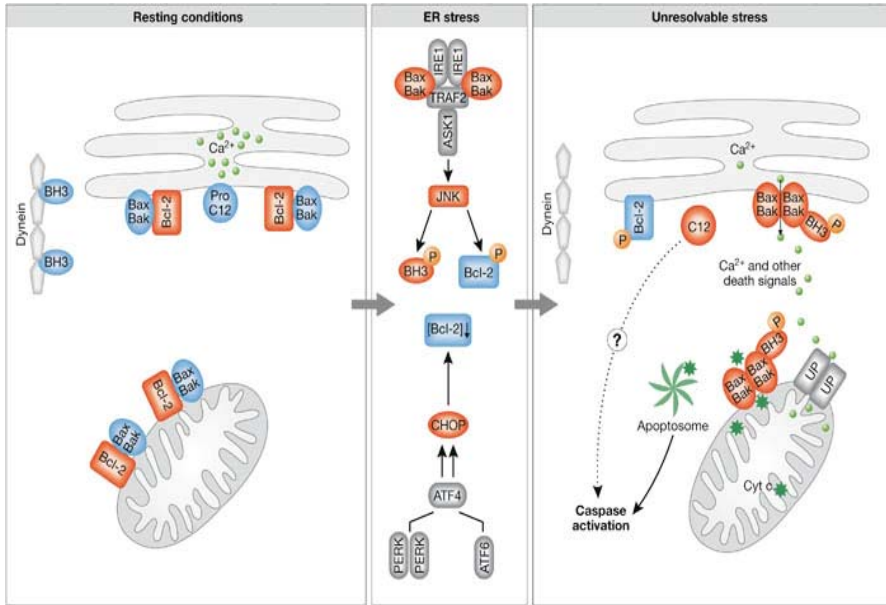


Figura 33. La famiglia proteica Bcl-2 in condizioni normali e di stress cellulare. In condizioni normali le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak sono mantenute inattive attraverso l'interazione con Bcl-2 sia nel reticolo endoplasmatico che nel mitocondrio. Bim (BH3) è inibita dal legame alla dineina citosolica. Condizioni di stress attivano invece la chinasi N-terminale di c-Jun (JNK) e GADD153 (CHOP). JNK fosforila Bcl-2 che così modificata non è più in grado di sequestrare ed inattivare le proteine pro-apoptotiche. Se lo stress è irreversibile il reticolo endoplasmatico può attivare la via apoptotica mitocondrio dipendente o indipendente.

3.7.5 Fase III: esecuzione della morte cellulare

Il rilascio del Ca^{++} immagazzinato nel reticolo endoplasmatico è successivamente in grado di attivare la via apoptotica mitocondrio-dipendente o quella mitocondrio-indipendente (Figura 34) (Ma et al., 2004). Entrambe le vie convergono nell'attivazione della caspasi-12 murina (o caspasi-4 umana) con conseguente attivazione della caspasi-9 e della caspasi-3, effattrice della morte cellulare. La caspasi-12 viene attivata nella via mitocondrio-indipendente o da IRE1 e TRAF2 oppure dalle calpaine. Queste ultime sono una famiglia di proteasi a cisteina calcio-dipendenti di cui due isoizimi μ - e m -calpaina sono espresse ubiquitariamente (Carafoli et al., 1998). Contrariamente alle caspasi, che sono attive solo durante l'apoptosi, le calpaine sono implicate in una serie di processi importanti per il normale metabolismo cellulare (Potter et al., 1998; Yuan et al., 1997).

3.8 Scotin: una nuova proteina pro-apoptotica espressa nel reticolo endoplasmatico

3.8.1 *Scotin*: struttura del gene

Il gene *Scotin* è stato clonato nel 2002 e mappa sul cromosoma 3 umano (3p21.3) in una regione altamente sensibile a riarrangiamenti cromosomici aberranti e delezioni nel cancro (Mitelman et al., 1997). Il cDNA è lungo 2.2 kb ed è composto da 6 esoni più una lunga regione al 3' non tradotta (Bourdon et al., 2002) La proteina comprende un dominio N-terminale con una putativa sequenza segnale di 22 aminoacido seguita da un dominio centrale transmembrana e da un dominio ricco in prolina. La sua sequenza risulta essere altamente conservata (l'omologia è pari al 70%) dal topo all'uomo. Esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che *Scotin* risulta essere espresso a livello del reticolo endoplasmatico e della membrana nucleare. Il dominio ricco in prolina risulta essere necessario per la localizzazione nel reticolo endoplasmatico.

3.8.2 *Scotin* e p53

Scotin è stato isolato mediante “differential display” dopo irraggiamento γ di topi selvatici (wild type) e *p53*^{-/-}. La sua espressione risultava infatti

INTRODUZIONE

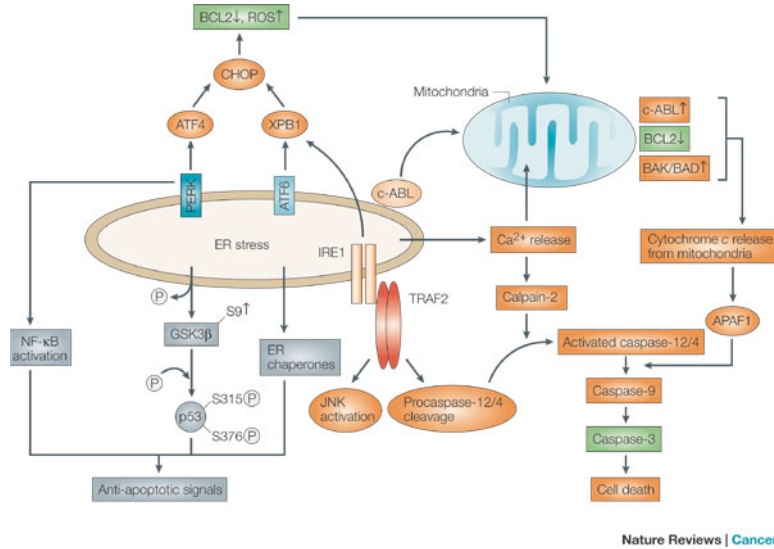


Figura 34. Attivazione della via apoptotica mitocondrio-dipendente o mitocondrio-indipendente in risposta a condizioni di stress del reticolo endoplasmatico. Lo stress del reticolo endoplasmatico origina l'attivazione di CHOP, la traslocazione della chinasi c-ABL nella membrane mitocondriale e l'attivazione di BAK/BAD e i membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2. I sensori dello stress cellulare IRE1, PERK ed ATF6 favoriscono il rilascio del calcio depositato nel lume del reticolo endoplasmatico. Quest'ultimo attiva la caspasi-12 nel topo (caspasi-4 nell'uomo) attraverso la via mitocondrio-dipendente con conseguente rilascio del citocromo *c* e formazione dell'apoptosoma. Il Calcio può inoltre attivare, mediante la calpaina o IRE1/TRAF2, la via apoptotica mitocondrio-indipendente. L'attivazione della chinasi-3β della glicogeno sintasi (GSK3β) favorisce la fosforilazione di p53 con sua conseguente degradazione in cellule cancerogene. Ciò determina infatti la protezione dall'apoptosi p53-mediata unitamente all'attivazione di NF-κβ che attiva la via anti-apoptotica. I radicali dell'ossigeno (ROS) sono infine in grado di attivare la risposta apoptotica.

fortemente indotta nel timo e nella milza di topi selvatici irradiati ma non in quella di topi *p53* knock-out (Bourdon et al., 2002). Esperimenti condotti su fibroblasti murini dopo trattamento con raggi UV-C o actinomomicina D (un forte attivatore di *p53*) (Blattner et al., 1999; Nakano et al., 2001) hanno chiaramente dimostrato che Scotin è una proteina pro-apoptotica indotta in risposta a danno del DNA (stress cellulare) in maniera *p53*-dipendente. Nel promotore del gene murino è stato infatti isolato un putativo sito di legame per *p53* e saggi EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) hanno provato la capacità di *p53* di legare tale sito (Bourdon et al., 2002).

3.8.3 Scotin e lo stress del reticolo endoplasmatico

L'attivazione dell'espressione di scotin nelle linee cellulari Saos-2 e H1299 (entrambe prive di *p53*) è capace di indurre morte cellulare in maniera *p53*-indipendente. La localizzazione di Scotin nel reticolo endoplasmatico lascia presupporre che tale gene possa mediare la morte cellulare indotta dal reticolo endoplasmatico in risposta a stress cellulari. L'attività pro-apoptotica di Scotin è inibita inoltre dal trattamento con zVAD (un potente inibitore delle caspasi) suggerendo così che tale evento sia mediato dall'attivazione delle caspasi. A supporto di ciò c'è la capacità di Scotin di attivare la caspasi effettrice-3 *in vitro* (Bourdon et al., 2002).

3.9 Scotin e *p73*

p73 è un altro membro della famiglia di *p53* in grado come quest'ultimo di indurre morte cellulare. Questo gene è trascritto da due promotori distinti originando, in omologia con *p63*, due proteine con effetti opposti: TAp73 con capacità pro-apoptotica e Δ Np73, mancante del dominio di transattivazione, anti-apoptotico (Fig.23) (Grob et al., 2001). In particolare l'isoforma TAp73 induce morte cellulare mitocondrio-dipendente con attivazione di Bax e rilascio del citocromo c (Ramadan et al., 2005). Il nostro gruppo ha inoltre dimostrato che quest'ultima via potrebbe non essere l'unica via di attivazione utilizzata da TAp73 nell'indurre apoptosi. La sovra-espressione di TAp73 α , non di Δ Np73 α , è capace di cambiare la morfologia del reticolo endoplasmatico nella linea cellulare inducibile Saos-2. TAp73 α induce infatti sia una modificazione nella localizzazione sub-cellulare della calnexina, un "chaperone" del reticolo endoplasmatico che

INTRODUZIONE

assiste il corretto ripiegamento delle proteine, sia cambiamenti nella concentrazione del calcio libero intra-cellulare (Terrinoni et al., 2004). Inoltre TAp73 α è in grado di attivare l'espressione di GADD153/CHOP, un fattore di trascrizione indotto in condizioni di stress del reticolo endoplasmatico (Terrinoni et al., 2004). In conclusione TAp73 α , in omologia con p53, può indurre la morte cellulare attraverso il reticolo endoplasmatico, che è un importante sensore dei segnali di stress intracellulari.

SCOPO DELLA TESI

Il processo di formazione dell'epidermide termina con la formazione di un rivestimento proteico specializzato depositato appena sotto la superficie interna della membrana plasmatica denominato involucri corneo. Quest'ultimo è costituito da una serie di proteine strutturali assemblate tra di loro grazie all'azione degli enzimi transglutaminasi (TGasi). Le TGasi catalizzano la reazione di trasferimento Ca^{2+} -dipendente di un gruppo γ -carbossiamidico di una glutamina e il gruppo ϵ -aminico di una lisina con la formazione di complessi macromolecolari insolubili legati tra di loro dal legame iso-peptidico. Nove membri della famiglia delle TGasi sono stati isolati e quattro (TGasi 1, TGasi 2, TGasi 3 e TGasi 5) sono espresse nell'epidermide. Durante il complesso processo che porta alla formazione dell'involucro corneo svolge però un ruolo fondamentale anche il gene p63. Questo fattore di trascrizione, membro della famiglia di p53, è espresso principalmente nello strato basale dell'epidermide e la sua assenza causa la nascita di topi in cui l'epidermide insieme agli altri epitelii stratificati risulta essere completamente assente.

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato sia quello di chiarire il ruolo svolto dalla TGasi 3 durante il processo di formazione dell'involucro corneo che quello di analizzare nuovi geni bersaglio regolati da p63 durante il differenziamento epidermico. Per chiarire il ruolo svolto dalla TGasi 3 in tale processo abbiamo deciso di creare topi knock-out-condizionali grazie all'utilizzo del sistema *Cre/loxP*. È possibile abolire così l'espressione del gene bersaglio in maniera tessuto-specifica ed analizzare poi il fenotipo dei topi ottenuti. La TGasi 3 risulta essere espressa infatti non soltanto nell'epidermide ma anche nel cervello quindi l'eliminazione selettiva in ognuno di questi due compartimenti consentirà una più approfondita analisi. Questo modello di studio fornirà inoltre una prova *in vivo* sul ruolo svolto dalla TGasi 3, poiché attualmente ci sono principalmente dati biochimici *in vitro* che avvalorano l'ipotesi di un coinvolgimento di tale enzima nel processo di formazione dell'epidermide. Con la finalità di individuare nuovi geni regolati dal fattore trascrizionale p63 abbiamo invece analizzato, nella seconda parte di questo lavoro di tesi, il ruolo svolto da *Scotin* durante il differenziamento epidermico. L'espressione di questo gene, localizzata nel reticolo endoplasmatico e nella membrana nucleare, è risultata essere regolata da p63. Questo gene è trascritto, grazie alla presenza di due promotori, in due differenti isoforme: TA e ΔN . La prima presenta il dominio di transattivazione necessario per l'attivazione dei geni che contengono nel loro promotore il motivo di legame per p53, mentre ΔN ne è privo. In particolar modo l'isoforma TA risulta attivare trascrizionalmente

SCOPO DELLA TESI

Scotin. Questo studio ha permesso quindi di correlare il differenziamento epidermico con l'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico, permettendo così l'acquisizione di nuove conoscenze riguardanti il complesso meccanismo che porta alla formazione dell'involucro corneo dove la duplice azione di p63 a monte e quella delle transglutaminasi a valle risultano essere determinanti.

RISULTATI

4.1 Isolamento di nuove varianti di splicing per la transglutaminasi 3

4.1.1 Espressione delle TGasi epidermiche in differenti tessuti ed organi murini

Con la finalità di chiarire il ruolo svolto dalla transglutaminasi 3 (TGasi 3) durante il differenziamento epidermico abbiamo analizzato l'espressione di tale enzima in differenti organi e tessuti murini isolati da topi selvatici adulti. Unitamente all'espressione della TGasi 3 abbiamo esaminato anche l'espressione delle altre TGasi epidermiche (TGasi 1, TGasi 2 e TGasi 5) per valutare se l'espressione di questi membri, appartenenti alla stessa famiglia, fosse più o meno ridondante nei differenti organi. Il risultato della PCR non quantitativa è riportato in figura 1. La TGasi 1 oltre ad essere espressa, a livello trascrizionale, nella pelle è presente nei reni, nel fegato, nei polmoni e nello stomaco di topi selvatici dopo 27 cicli di PCR. Dopo 33 cicli di PCR è possibile osservare un più ampio spettro di espressione della TGasi 1, ma questo potrebbe essere dovuto a contaminazioni al momento dell'isolamento dei differenti organi che un numero maggiore di amplificazioni di PCR porterebbe evidenziare. L'espressione della TGasi 1 nello stomaco è facilmente spiegabile se si considera che nei roditori la mucosa gastrointestinale, come la lingua e la bocca dello stomaco, forma un epitelio squamoso e stratificato con cheratinociti simili a quelli presenti nell'epidermide. (Hitomi et al., 2001). La TGasi 2 mostra invece un'ubiquitarità di espressione in tutti gli organi analizzati già dopo 27 cicli di amplificazione. Per quanto riguarda invece la TGasi 3 abbiamo riscontrato che oltre nella pelle, questo enzima risulta essere espresso nello stomaco, come per la TGasi 1, ma anche nel cervello già dopo 27 cicli di amplificazione. La TGasi 5 mostra invece una chiara e predominante espressione nella pelle, nello stomaco e nei reni. Quest'analisi preliminare dimostra come le TGasi analizzate non siano espresse unicamente nelle pelle, ma possano svolgere funzioni, ancora non note, anche in altri tessuti con spettri d'espressione tra di loro non totalmente sovrapponibili.

RISULTATI

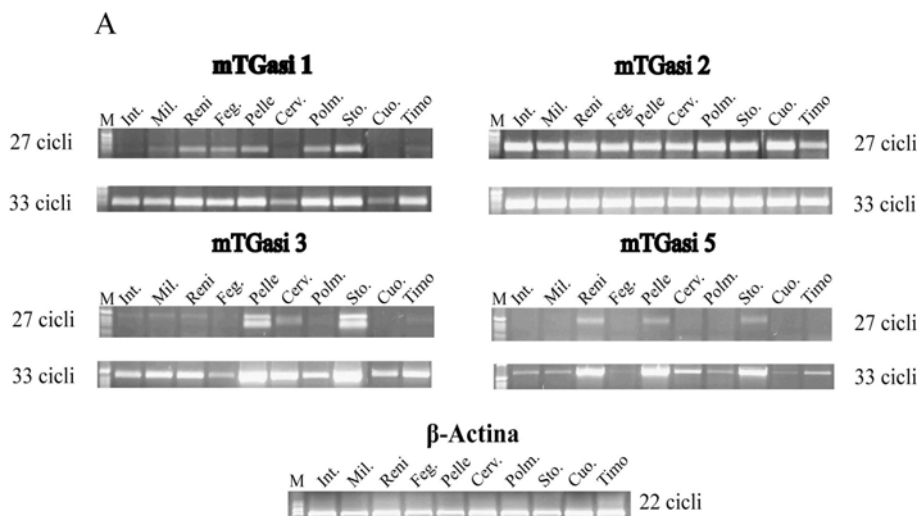
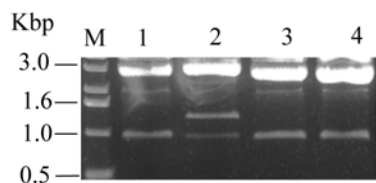


Figura 1. *Espressione delle TGasi in differenti tessuti ed organi murini.* Espressione delle transglutaminasi (TGasi) 1, 2, 3, e 5 in differenti tessuti ed organi di topi selvatici. La PCR (27 e 33 cicli di amplificazione) evidenzia che l'espressione, a livello trascrizionale, delle quattro TGasi non è localizzata soltanto nell'epidermide. Int.=Intestino; Mil.=Milza; Feg.=Fegato; Cerv.=Cervello; Polm.=Polmoni; Sto.=Stomaco; Cuo.=Cuore. La β -Actina mostra la corretta retrotrascrizione in tutti i tessuti analizzati.

4.2 Isolamento della variante di splicing $\Delta 6\Delta 7$ della TGasi 3 murina

Con la finalità di clonare il cDNA murino della TGasi 3 abbiamo retrotrascritto l'mRNA precedentemente estratto dalla pelle di topi selvatici. La digestione diagnostica, mostrata in figura 2A, presenta un profilo di digestione non atteso. Alcune colonie analizzate (colonia 2) mostrano il profilo di digestione previsto, mentre un'altra percentuale di colonie positive presenta un'unica banda di digestione (colonia 1, 3, 4) esclusa quella del vettore. Il sequenziamento di queste ultime colonie ha dimostrato la presenza di una forma tronca della TGasi 3. Quest'ultima manca dell'esone 6 e 7 e l'ablazione di questi due esoni unisce l'esone 5 all'8 determinando un cambiamento del corretto schema ("frame") di lettura. Ciò causa inoltre l'inserimento di sei nuovi aminoacidi nell'esone 8 seguiti da un prematuro codone di stop come mostrato in figura 2B. E' interessante notare che nell'esone 6 è localizzata la cisteina catalitica dell'enzima. Con la finalità di analizzare se tale variante fosse originata a seguito di una mutazione sul DNA genomico dei topi analizzati o se fosse dovuta ad un processo di splicing alternativo abbiamo amplificato e sequenziato gli esoni 5, 6, 7, 8 con le relative regioni introniche fiancheggianti. Le sequenze non hanno evidenziato alcuna mutazione nei siti accettori o donatori di splicing di tali esoni, dimostrando così che tale variante, denominata $\Delta 6\Delta 7$, si origina durante il processo di maturazione dell'RNA nucleare eterogeneo (hnRNA) e non è dovuta invece ad una mutazione nel DNA genomico. L'analisi condotta su un numero discreto di topi, di cui soltanto un campione rappresentativo di quattro è mostrato in figura 3, ha ulteriormente validato tale ipotesi. La figura 3A mostra infatti due differenti tipi di amplificazione compiute per verificare la presenza della variante $\Delta 6\Delta 7$ della TGasi 3. L'amplificazione con la coppia di primers mTG3F4/R4 origina soltanto l'amplificato prodotto dalla retrotrascrizione dell'mRNA "full lenght" della TGasi 3 (Figura 3B) nei topi analizzati, ma non quello di minore peso molecolare derivante dalla variante di splicing. La PCR compiuta invece con la coppia di primers mTG3F2splic./R2splic amplifica soltanto una regione del cDNA derivante dalla retrotrascrizione della variante $\Delta 6\Delta 7$, in quanto l'oligo reverse è localizzato metà sulla fine dell'esone cinque e l'altra metà si trova invece all'inizio dell'esone otto. E' possibile notare in figura 3C che tutti e quattro i topi analizzati, non parenti tra di loro, mostrano la banda attesa dall'amplificazione del cDNA retrotrascritto dall'mRNA dell'isoforma $\Delta 6\Delta 7$. La frequenza di questo prodotto risulta essere troppo elevata per derivare da una mutazione nel DNA genomico.

A



B



Figura 2. *Clonaggio del cDNA murino della transglutaminasi 3.* (a) La digestione con l'enzima di restrizione EcoRI (E) evidenzia la presenza di una colonia selvatica (2) che presenta le due bande di digestione attese (920 bp e 1290 bp). Le altre 3 colonie (1, 3, 4) mostrano soltanto una banda (970 bp). (b) Rappresentazione schematica della variante di splicing $\Delta 6\Delta 7$. Il rettangolo grigio mostra la presenza di un'alterazione (shift) nel corretto schema di lettura. Quest'ultimo determina l'inserimento di 6 nuovi amino acidi unitamente all'inserzione di un codone di stop prematuro nella variante murina $\Delta 6\Delta 7$ della TGasi 3.

RISULTATI

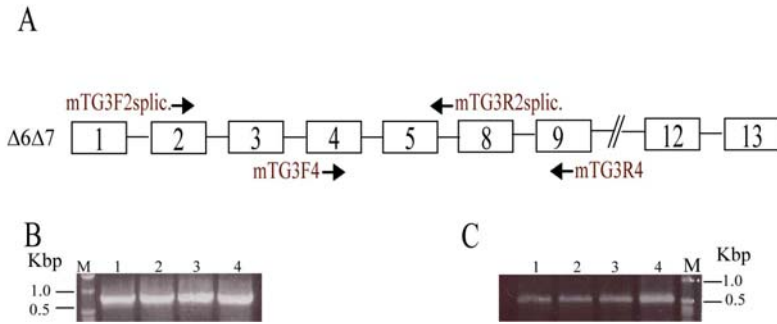


Figura 3. La variante di splicing ($\Delta 6\Delta 7$) della TGasi 3 è presente in tutti i topi selvatici analizzati. (a) Rappresentazione schematica delle PCR realizzate sull'mRNA estratto e retrotrascritto da piccole biopsie di cute murina. La coppia di primers mTG3F4/R4 origina un frammento di circa 800 bp nel trascritto selvatico, mentre nel trascritto $\Delta 6\Delta 7$ la banda è di circa 540 paia di basi. La coppia di primers mTG3F2splic/R2splic amplifica solo la variante tronca ($\Delta 6\Delta 7$) in quanto il primer reverse è localizzato metà sulla fine dell'esone 5 e l'altra metà all'inizio dell'esone 8. (b) La PCR con gli oligo mTG3F4/R4 evidenzia solo l'amplificato selvatico nei 4 campioni analizzati. (c) La PCR condotta con i primers mTG3F2splic/R2splice evidenzia la presenza del trascritto tronco in tutti e quattro i campioni analizzati.

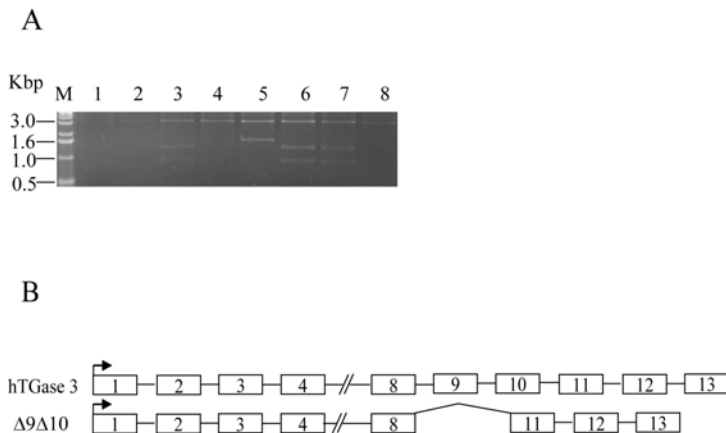


Figura 4. Isolamento di una nuova variante di splicing della TGasi 3 umana. (a) La digestione con l'enzima di restrizione *EcoRI* (E) evidenzia la presenza di colonie contenenti tutto il trascritto (una banda di 840 bp ed una di 1270 bp) della TGasi 3 umana (3, 6, 7), accanto ad altre colonie contenenti solo il vettore vuoto (1, 2, 4, 8). La colonia 5 mostra solo una banda di 1550 bp. (b) Rappresentazione schematica della transglutaminasi 3 umana selvatica e della sua variante di splicing ($\Delta 9\Delta 10$). Quest'ultima manca degli esoni 9 e 10, ma il corretto schema di lettura del gene risulta essere conservato.

4.2.1 Isolamento della variante $\Delta 9\Delta 10$ della TGasi 3 umana

Dopo l'isolamento della variante $\Delta 6\Delta 7$ della TGasi 3 ci siamo chiesti se tale variante fosse originata anche durante lo splicing della TGasi 3 umana, in quanto era stato precedentemente dimostrata la presenza di varianti di splicing nel gene *TGM1*, *TGM2* e *TGM5* umano (Aeschlimann et al., 1998; Shevchenko et al., 2000; Candi et al., 2001; Citron et al., 2001). Il clonaggio del cDNA della TGasi 3 umana non ha evidenziato la presenza della variante $\Delta 6\Delta 7$ isolata nel topo, tuttavia un 10% di colonie positive (colonia 5) presentava delle bande di digestione anomale differenti da quelle attese (colonia 3, 6, 7) dalla digestione del cDNA della TGasi 3 umana con l'enzima (Figura 4A). Il sequenziamento di tali colonie ha dimostrato la presenza di una ulteriore variante di splicing del gene *TGM3*. Tale variante è priva degli esoni 9 e 10 ($\Delta 9\Delta 10$), ma l'ablazione di questi ultimi non altera il corretto schema di lettura come mostrato in figura 4B. La presenza della variante $\Delta 9\Delta 10$ della TGasi 3 è stata inoltre confermata da esperimenti di RT-PCR semiquantitativi condotti sia su cheratinociti umani in differenziamento che su biopsie di cute prelevate da individui normali o affetti da ittiosi lamellare. E' possibile osservare come il trascritto della variante $\Delta 9\Delta 10$, la cui presenza origina l'amplificato a minore peso molecolare, non cambia né durante il differenziamento dei cheratinociti umani (Figura 5A), né nelle biopsie dei pazienti affetti da ittiosi lamellare (Figura 5B). L'espressione di tale variante di splicing non sembra quindi possedere una manifesta funzione biologica.

4.2.2. Attività GTPasica e di "cross-linking" nelle varianti di splicing isolate

La TGasi 3, come la TGasi 2 e la TGasi 5, presenta un'attività di GTPasi (Liu et al., 2002; Ahvazi et al., 2003; Ahvazi et al., 2004a; Candi et al., 2004). La tasca legante il GTP è composta dai residui Asn¹⁶⁸ e Arg¹⁶⁹ del dominio catalitico e dai residui Lys⁴⁸⁵, Lys⁴⁸⁷, Val⁴⁸⁸, Met⁴⁹¹, Leu⁴⁹² (primo foglietto- β), Arg⁵⁸⁷, Asp⁵⁸⁸, Ile⁵⁹⁰, Leu⁵⁹¹, e Asp⁵⁹² (ultimo foglietto- β -strand) del β -barile 1. Sulle basi di tale struttura la variante $\Delta 6\Delta 7$ della TGasi 3 è inattiva in quanto manca della cisteina catalitica (localizzata nell'esone 6) necessaria per "l'attività di cross-linking" ed inoltre quest'ultima non possiede alcuna attività GTPasica a causa del prematuro codone di stop inserito all'inizio dell'esone otto. L'attività GTPasica sembra essere

RISULTATI

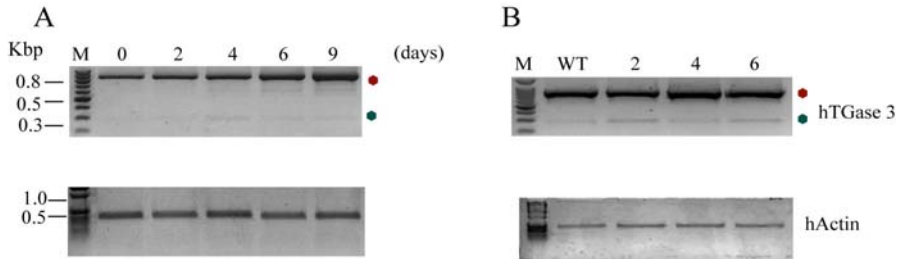


Figura 5. *La variante di splicing ($\Delta 9\Delta 10$) è espressa nelle NHEK e nell'uomo.* (a) La PCR semiquantitativa compiuta su NHEK in differenziamento (0, 2, 4, 6, 9 giorni) mostra la presenza di un amplificato a più alto peso molecolare (850 bp) atteso dalla TGasi 3 selvatica (cerchio rosso). E' possibile notare anche un secondo trascritto (cerchio verde) a più basso peso molecolare (290 bp) che deriva dall'amplificazione della TGasi $\Delta 9\Delta 10$ (290 bp). Il pannello in basso mostra l'amplificazione della β -actina. (b) PCR semiquantitativa su biopsie di pelle prelevate da individui sani (wt) e affetti da ittiosi lamellare (1, 2, 3, 4). Nell'uomo sono presenti, come nelle NHEK, entrambi gli amplificati (cerchio rosso=selvatico; cerchio verde= variante di splicing). In basso è riportata di nuovo l'amplificazione della β -actina.

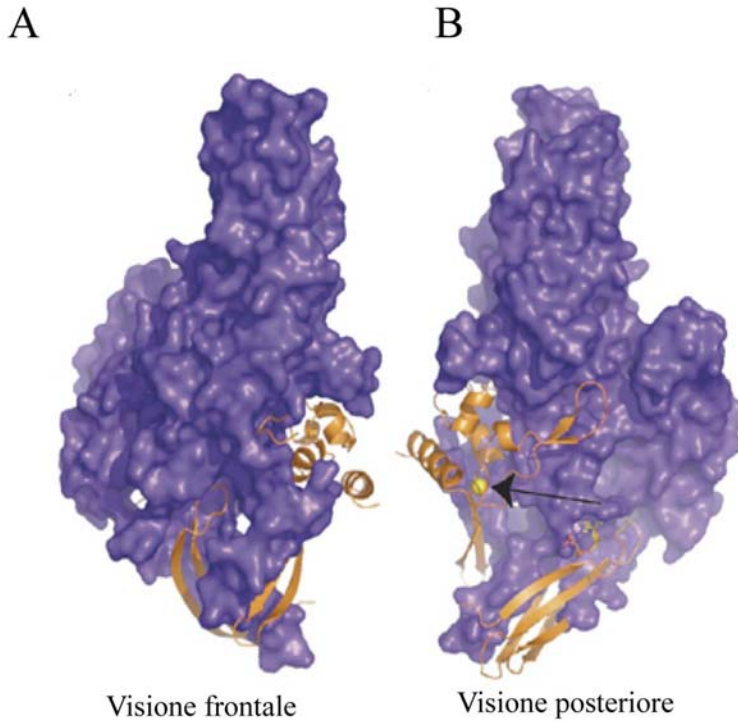


Figura 6. *Modello tridimensionale della TGasi 3 umana.*(a,b) Visione frontale e posteriore di un modello della transglutaminasi 3 umana. Le due immagini sono ruotate di 180° l'una rispetto all'altra. La regione arancione rappresenta la parte mancante nella variante di splicing $\Delta 9\Delta 10$. Il cerchio giallo, all'interno della regione arancione, rappresenta il Ca^{++} all'interno del secondo sito di legame per il Ca^{++} presente nella TGasi 3.

compromessa anche nella variante umana $\Delta 9\Delta 10$, poiché alcuni residui coinvolti nella formazione della tasca legante il GTP sono localizzati negli esoni 9 e 10. Tuttavia quest'ultima variante di splicing potrebbe conservare l'attività di "crosslinking" dal momento che i residui della triade catalitica non risultano essere persi, contrariamente alla variante $\Delta 6\Delta 7$. E' importante notare però come la variante $\Delta 9\Delta 10$ non possieda il secondo sito legante il Ca^{++} , importante per l'attivazione dell'enzima (Fig.6). Con la finalità di confermare la nostra ipotesi abbiamo condotto esperimenti di "cross-linking" *in vitro*. La figura 7 mostra come la variante di splicing umana sia circa 4 volte meno attiva della corrispondente TGasi 3 selvatica. Esperimenti di Western blot hanno dimostrato inoltre che la variante $\Delta 9\Delta 10$ risulta essere meno espressa o più rapidamente degradata dopo la trasfezione in cellule HEK-293 (Fig.8A). L'efficienza di trasfezione sia della forma selvatica della TGasi 3 che di quella tronca risulta essere infatti la stessa come dimostrato dall'espressione della GFP in co-trasfezione con la TGasi 3 (Fig.8B). RT-qPCR $\Delta 9\Delta 10$ hanno dimostrato che i livelli dei due trascritti sono tuttavia paragonabili (Fig.8C). Il minor quantitativo di proteina tradotta nella variante $\Delta 9\Delta 10$ potrebbe essere quindi causato da una maggiore degradazione di questa proteina tronca.

A

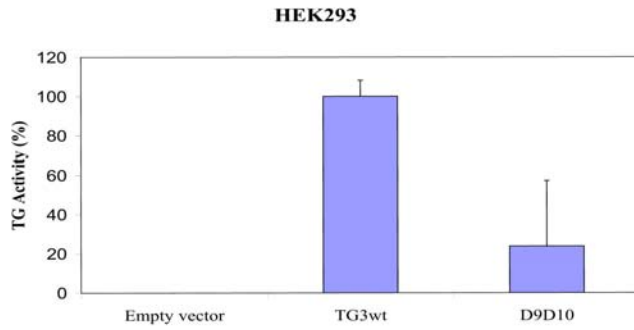


Figura 7. Misura dell'attività di "cross-linking" della transglutaminasi 3 e della sua variante di splicing $\Delta 9\Delta 10$. (a) La variante $\Delta 9\Delta 10$ è circa quattro volte meno attiva della TGasi 3 selvatica.

RISULTATI

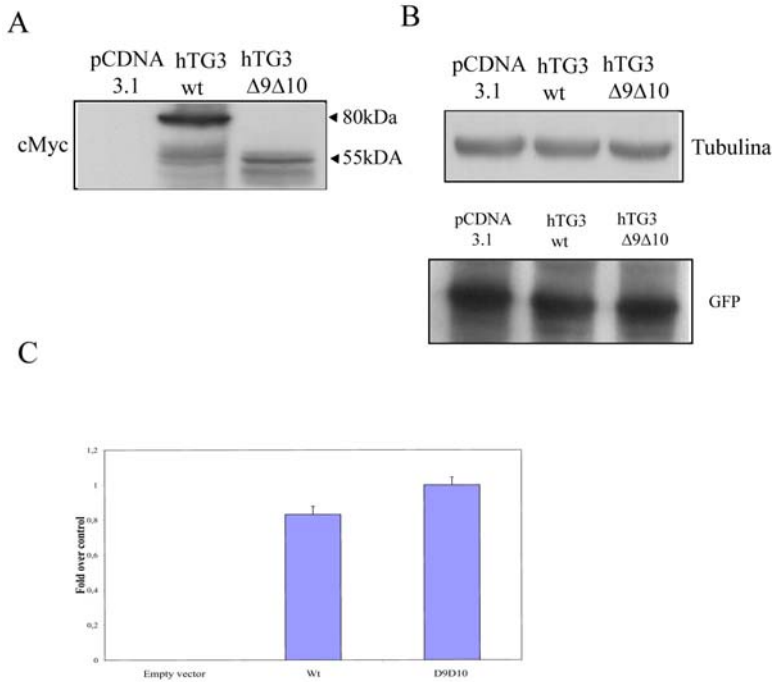


Figura 8. *Espressione della variante di splicing $\Delta 9\Delta 10$ nelle HEK-293.* (a) Western blot su lisati di cellulari (HEK-293) transfettati con la forma selvatica o con la variante di splicing della TGasi 3. L'anticorpo utilizzato è l'anti-myc tag. (b) Western blots per la normalizzazione sul caricamento dei tre lisati (anti-tubulina) e per l'efficienza di trasfezione (anti- GFP). (c) RT-qPCR su cellule (HEK-293) dopo la trasfezione con la TGasi selvatica o con la variante $\Delta 9\Delta 10$ utilizzando primers di amplificazione per la TGasi 3. La normalizzazione per l'efficienza di trasfezione è stata realizzata utilizzando primers disegnati sul cDNA della GFP. Quest'ultima è stata co-trasfettata insieme alla TGasi 3 nelle HEK-293.

4.3 Utilizzo del sistema Cre/*loxP* per la generazione di topi knock-out condizionali per la TGasi 3.

Con la finalità di chiarire il ruolo svolto dalla transglutaminasi 3 durante il differenziamento epidermico abbiamo deciso di generare topi in cui l'espressione del gene *TGM3* fosse selettivamente inattivata nei tessuti o organi d'interesse. Ciò è reso possibile attraverso l'utilizzo del sistema Cre/*loxP* precedentemente illustrato. Questo sistema garantisce un' inattivazione specifica del gene bersaglio e qualora, come nel caso della TGasi 3, il gene risulti espresso in differenti organi o tessuti è possibile analizzare separatamente il fenotipo dei topi ottenuti. L'eliminazione massiva dell'espressione della TGasi 3 nel topo potrebbe essere infatti letale e provocarne la morte già a livello embrionale impedendo così l'analisi del fenotipo della progenie ottenuta.

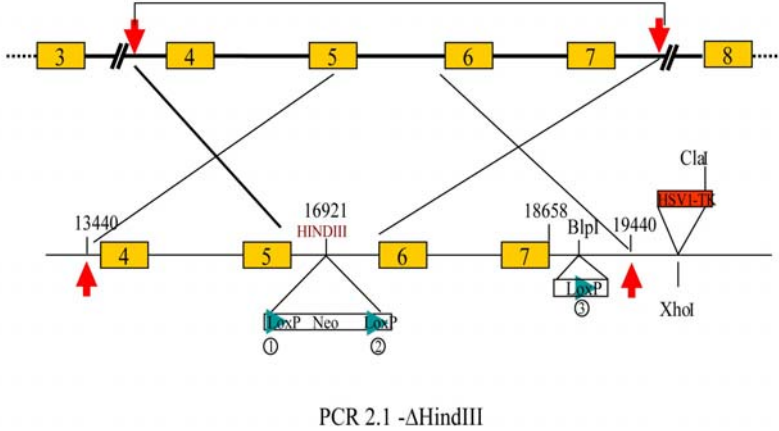
4.3.1 Rappresentazione schematica del vettore mTG3-cKO

In figura 9A è riportato lo schema del vettore da noi realizzato per la generazione dei topi TGasi 3 knock-out condizionali (cTG3-KO). La porzione di DNA genomico per la ricombinazione omologa include gli esoni 4, 5, 6, e 7 con le relative regioni introniche. Utilizzando il sito unico per l'enzima di restrizione HindIII, localizzato all'interno dell'introne 5, abbiamo clonato la cassetta della neomicina (marcatore di selezione positivo) contenente alle estremità due siti *loxP*. Il terzo sito *loxP* è stato introdotto utilizzando il sito unico per l'enzima BlnI localizzato nell'introne 7. E' importante notare che in tale costrutto sia l'esone 6 (contenente la cisteina catalitica) che il 7 si trovano tra due ripetizioni diretti dei siti *loxP*. Il marcatore di selezione negativo (*tk*) è stato inserito infine a valle della regione di ricombinazione utilizzando il sito di restrizione unico XhoI. La presenza della cassetta della timidina chinasi consente di scartare quei cloni di cellule ES in cui l'evento di ricombinazione sia andato oltre la regione di omologia. Questi cloni non sono infatti in grado di sopravvivere se al terreno viene aggiunto ganciclovir o un suo analogo. La ricombinazione del vettore linearizzato con l'allele del gene bersaglio avviene attraverso un duplice evento di crossing-over con i due bracci di ricombinazione (al 5' ed al 3') rispettivamente localizzati a monte ed a valle della cassetta della neomicina (dopo il terzo sito *loxP*). Dopo l'elettroporazione del vettore nelle cellule ES e la selezione dei cloni ricombinanti (neomicina resistenti) è necessario

RISULTATI

A

Vettore di ricombinazione: mTGasi 3 knock-out condizionale



B

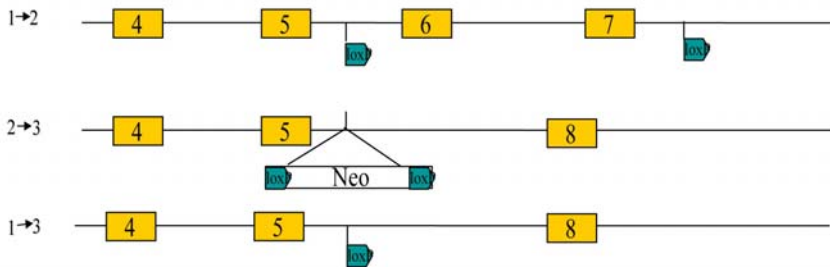


Figura 9. Schema del vettore di ricombinazione per la creazione di topi TG3-KO. (a) Il DNA genomico per la ricombinazione omologa è contenuto all'interno delle frecce rosse. La cassetta della neomicina (marker positivo) è inserita all'interno del vettore nell'introne 5 della TGasi 3 utilizzando il sito unico di restrizione HindIII (H). I tre siti *loxP* sono indicati dalle frecce azzurre. HSV-TK, il marker di selezione negativo, è indicato in rosso. (b) L'azione della ricombinasi Cre origina tre differenti prodotti di ricombinazione a secondo dei siti *loxP* coinvolti. Il prodotto 1-2 è quello selezionato per la creazione di topi knock-out condizionali per la TGasi 3. Il gene *TGM3* è infatti ancora integro, ma porta i due siti *loxP* all'interno dell'introne 5. Contrariamente gli altri due (2-3; 1-3) prodotti perdono alcuni esoni dopo l'azione della ricombinasi Cre.

eliminare la cassetta della neomicina e ciò si realizza attraverso l'aggiunta esogena della ricombinasi Cre alla cellule. La presenza di tre siti *loxP*, origina, a secondo della coppia di siti coinvolti, tre differenti prodotti di ricombinazione mostrati in figura 9B. Tra questi prodotti soltanto il primo (derivante dalla ricombinazione del primo e secondo sito *loxP*) presenta un'inalterata struttura genica, ma gli esoni 6 e 7 risultano ancora compresi tra tali siti. Gli altri 2/3 dei prodotti ottenuti generano alleli knock-out per il gene della *TGM3* in quanto la sua struttura genica risulta essere alterata.

4.3.2 Realizzazione del vettore mTG3-cKO: clonaggio del braccio di ricombinazione al 5'

Il primo passaggio compiuto per la realizzazione del vettore descritto nel precedente paragrafo è stato l'amplificazione (Fig.10A) della regione prescelta del gene *TGM3* da un estratto di DNA genomico di cellule staminali embrionali 129SvJ. Tale DNA è infatti isogenico con quello delle cellule ES in cui sarà successivamente elettroporato il nostro vettore. L'amplificato ottenuto è stato inizialmente clonato TA nel vettore pCR2.1 e la figura 10C mostra l'isolamento di una colonia positiva. L'amplificato genomico è stato poi exciso con l'enzima EcoRI e clonato successivamente nel vettore di destinazione finale PCR2.1- Δ HindIII. L'assenza del sito HindIII è stata confermata attraverso la digestione con tale enzima mostrata in figura 10B. L'inserimento della regione di ricombinazione al 5' è riportata in figura 10D e mostra l'isolamento di due colonie positive: una contenente l'inserto nel corretto orientamento (la prima) mentre la seconda nell'orientamento anti-senso.

4.3.3. Inserimento della cassetta della neomicina nel vettore mTG3-cKO

La cassetta contenente il marcatore di selezione positivo è stata inizialmente clonata TA nel vettore pGem-T-Easy (prime due colonie in figura 11A). La successiva digestione con l'enzima di restrizione HindIII ha permesso il clonaggio di questa cassetta all'interno del vettore pCR2.1- Δ HindIII contenente inoltre la regione di ricombinazione al 5' (terza e quarta colonia in figura 11A). Dopo avere selezionato la colonia contenente l'inserto nel corretto orientamento (Figura 11B) abbiamo clonato il terzo sito

RISULTATI

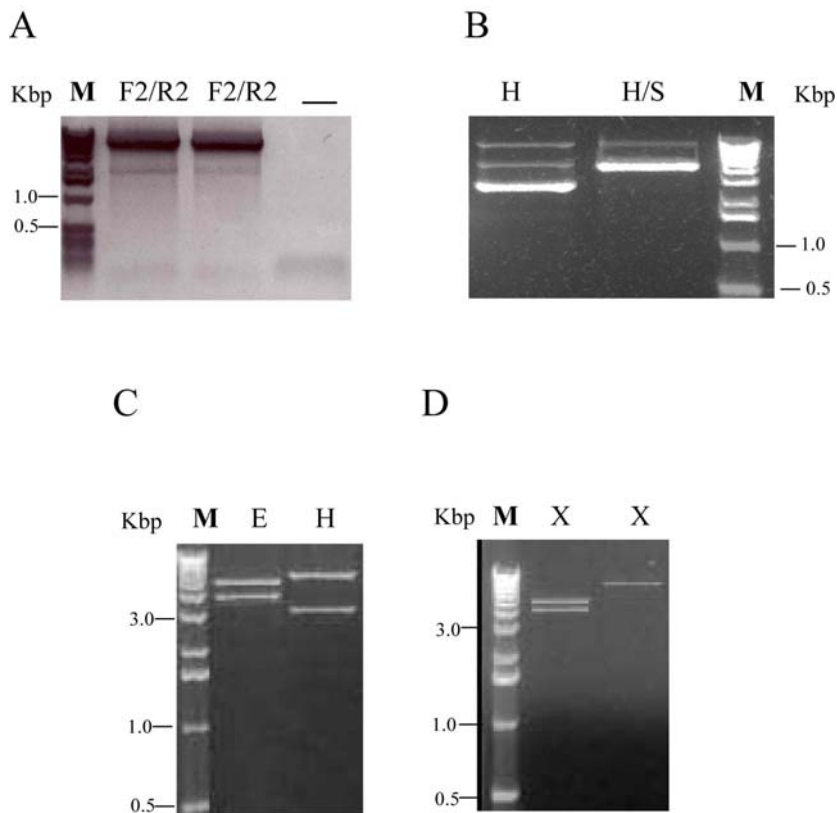


Figura 10. *Clonaggio del braccio di ricombinazione al 5' all'interno di PCR2.1- Δ HindIII.* (a) Amplificazione del gDNA con gli oligo mTG3contigF2/R2 (5.2 Kb). (b) Rimozione del sito HindIII (H) dal vettore pCR2.1. Digestione prova con HindIII che non linearizza il vettore, mentre la digestione con XbaI/HindIII (X/H) lo linearizza. (c) La digestione con EcoRI della colonia positiva excide l'inserto dal vettore (2 bande: 5.2 Kb e 4 Kb), mentre la digestione con HindIII conferma il corretto orientamento del clone selezionato (2bande: 3Kb e 6.2 Kb) clonato in pCR2.1. (d) Clonaggio della regione al 5' all'interno di PCR2.1- Δ HindIII. Le due colonie digerite con XbaI (X) mostrano la prima l'orientamento senso (5 Kb e 4.2Kb), mentre nella seconda l'inserto è clonato anti-senso (9 Kb e 250 bp).

loxP. Quest'ultimo è stato inserito per PCR all'interno del lungo introne localizzato dopo l'esone 7. Il frammento selezionato è stato inizialmente clonato TA nel vettore pGem-T-Easy (Figura 11C e 11D) e successivamente clonato nel vettore finale di destinazione come mostra la figura 11E.

4.3.4. Inserimento della cassetta della timidina chinasi

L'ultimo passaggio nella realizzazione di tale costrutto è stato l'inserimento del marcatore di selezione negativo. Il frammento è stato exciso, mediante digestione, dal vettore pTK come mostrato in figura 12A. Quest'ultimo è stato clonato successivamente nel vettore mTG3c-KO come mostrato in figura 12B. Il corretto orientamento delle colonie isolate è mostrato in figura 12C. È possibile notare l'isolamento di tre colonie contenenti la cassetta tk nel corretto orientamento. Il vettore mTG3-cKO finale presenta un peso molecolare di 13.6 Kb.

4.4 Analisi dei cloni di cellule ES ottenuti dopo l'elettroporazione con il vettore mTG3-cKO

Il vettore realizzato è stato utilizzato per la successiva elettroporazione in cellule staminali embrionali murine (ES) 129SvJ dopo essere stato linearizzato. I cloni cellulari che avevano incorporato il costrutto sono stati selezionati per la loro resistenza alla neomicina e successivamente abbiamo ricevuto una replica di ogni piastra per l'estrazione del DNA genomico con la finalità di analizzare l'evento di ricombinazione in tali cloni.

4.4.1 Analisi dei cloni di cellule staminali dopo l'elettroporazione

L'elevato numero dei cloni ottenuti (circa 400) ci ha indotto a condurre una prima analisi dell'evento di ricombinazione mediante la PCR. A questa avrebbe poi fatto seguito un'analisi più approfondita mediante Southern blot dei cloni selezionati. La PCR è stata realizzata con un oligo reverse localizzato sulla neomicina ed uno forward posizionato invece circa 300 paia basi a monte della regione di ricombinazione al 5'. Questo tipo di PCR ci consentiva di selezionare non soltanto i cloni cellulari che avessero incorporato il plasmide all'interno della cellula, ma più specificatamente di

RISULTATI

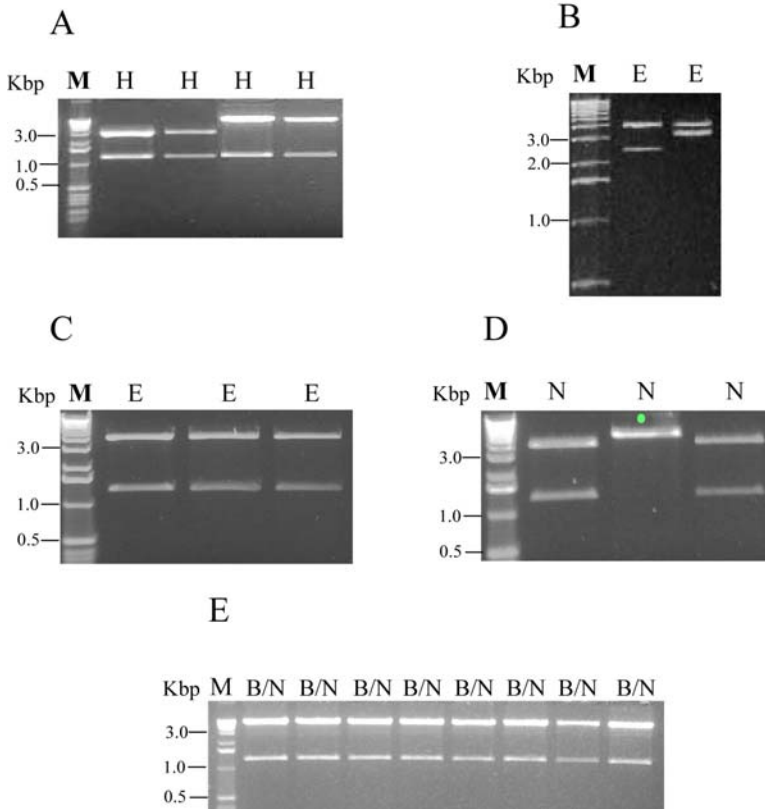


Figura 11. Clonaggio della cassetta della neomicina e del terzo sito *loxP*. (a) La cassetta della neomicina (contenente anche i due siti *loxP* alle estremità) è stata inizialmente clonata nel pGemT-Easy (prime due colonie digerite HindIII) e da questo è stata excisa per il clonaggio in pCR2.1- Δ HindIII (terza e quarta colonia digerite HindIII). (b) Le due colonie selezionate, se digerite con EcoRI (E), mostrano la prima l'orientamento anti-senso (3.2 Kb e 4 Kb) e la seconda orientamento senso (4Kb e 2.4 Kb). (c) Digestione diagnostica con EcoRI della regione contenente il terzo sito *loxP* clonata in pGemT-Easy. La foto mostra 3 colonie positive. (d) Digestione con l'enzima di restrizione NotI (N) per verificare l'orientamento delle tre colonie. Solo la colonia centrale (pallino verde) mostra l'orientamento senso (1 banda a 5.2 Kb). (e) Clonaggio della regione contenente il terzo sito *loxP* nel vettore di destinazione finale pCR2.1- Δ HindIII. La doppia digestione con gli enzimi BspI/NotI (B/N) mostra che tutte ed 8 le colonie sono positive per l'inserto.

RISULTATI

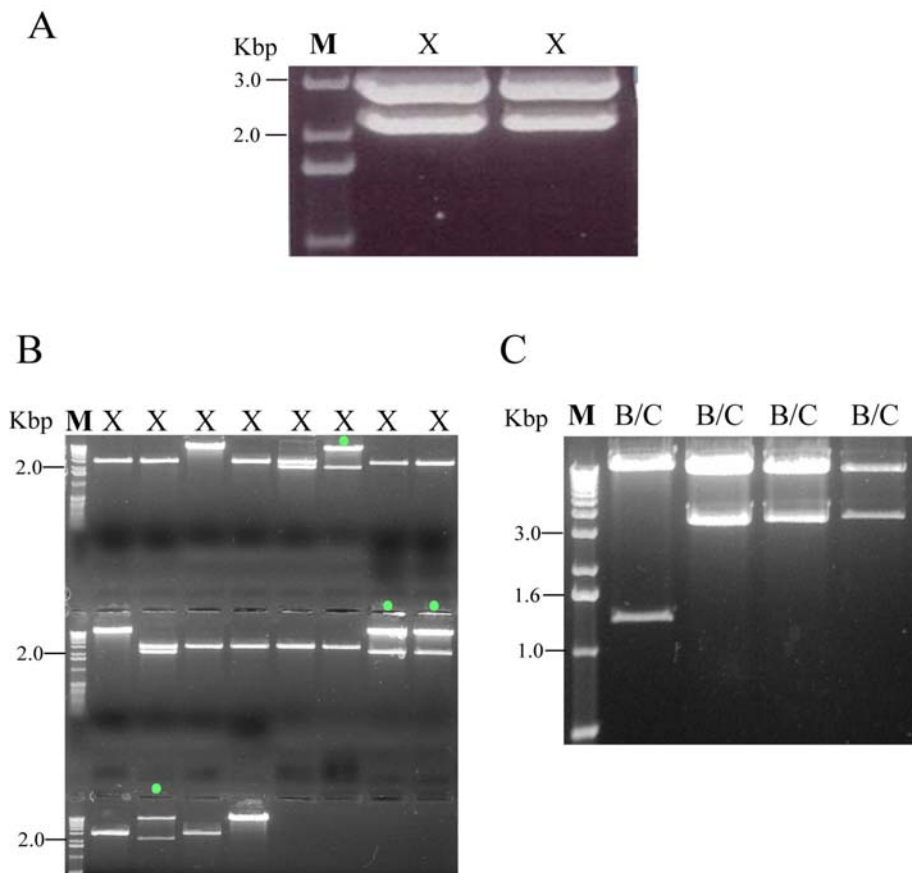


Figura 12. *Clonaggio del marker di selezione negativa (HSV-TK) in pCR2.1- Δ HindIII.* (a) Excisione della cassetta della neomicina con l'enzima XhoI (X) dal vettore pTK. (b) Clonaggio della cassetta della timidin chinasi nel vettore pCR2.1- Δ HindIII e digestione diagnostica con XhoI (X). Le colonie positive sono indicate con i pallini verdi. (c) Digestione per l'orientamento delle 4 colonie selezionate con gli enzimi BlnI/ClaI (B/C). La prima colonia è orientata anti-senso (1.2 Kb e 12.4. Kb), mentre nelle altre tre colonie il frammento clonato presenta l'orientamento corretto (3.4 Kb e 10.2Kb).

selezionare quelli in cui all'incorporazione del vettore era seguito l'evento di ricombinazione nel locus genico del gene *TGM3*. Ciò si realizza poiché i cloni che presentano il plasmide che non abbia ricombinato o che abbia ricombinato in un locus genico differente da quello del gene bersaglio non mostrano alcun l'amplificato. L'oligo forward infatti non è contenuto all'interno della regione di ricombinazione, ma si trova invece alcune centinaia di basi a monte di esso nel DNA genomico. Prima di utilizzare tale PCR per l'analisi dei cloni era però necessario realizzare un positivo di PCR per verificare la funzionalità della coppia dei primers selezionata.

4.4.2 Test sulla funzionalità dei primers mediante clonaggio del positivo di PCR

La realizzazione del positivo di PCR ha richiesto un'ulteriore serie di clonaggi. Il primo passaggio è stato l'inserimento di una coppia di oligo complementari, precedentemente appaiati (doppio filamento), di circa 60 paia di basi contenenti al loro interno la sequenza del primer forward selezionato. Per esigenze legate ai siti di restrizione (il sito utilizzato per il clonaggio dell'oligo tagliava oltre che a monte del gDNA clonato anche all'interno della cassetta della neomicina) abbiamo inserito la coppia di oligo non nel vettore finale, ma in quello intermedio contenente soltanto il braccio di ricombinazione al 5'. L'analisi delle colonie positive è stata compiuta, come mostrato in figura 13A, mediante PCR. Il clonaggio non presentava infatti direzionalità ed era quindi necessario scegliere quelle colonie che avessero inserito la coppia di oligo complementari nell'orientamento senso. L'oligo forward utilizzato era quello prescelto per l'analisi dei cloni ES, mentre quello reverse era localizzato all'interno del DNA genomico clonato nel vettore. Successivamente è stata inserita la cassetta della neomicina, come mostrano le digestioni diagnostiche (Figura 13B). Abbiamo poi testato la funzionalità della coppia di primers selezionata per l'analisi dei cloni di cellule ES. La figura 13C evidenzia come anche a basse concentrazioni del plasmide (10^{-3} pg) la PCR origini l'amplificato del peso molecolare atteso.

4.4.3 Analisi dei cloni di cellule ES dopo l'elettroporazione

Dopo aver testato la funzionalità dei primers da utilizzare per la PCR abbiamo estratto il DNA genomico estratto dai circa 400 cloni analizzati.

RISULTATI

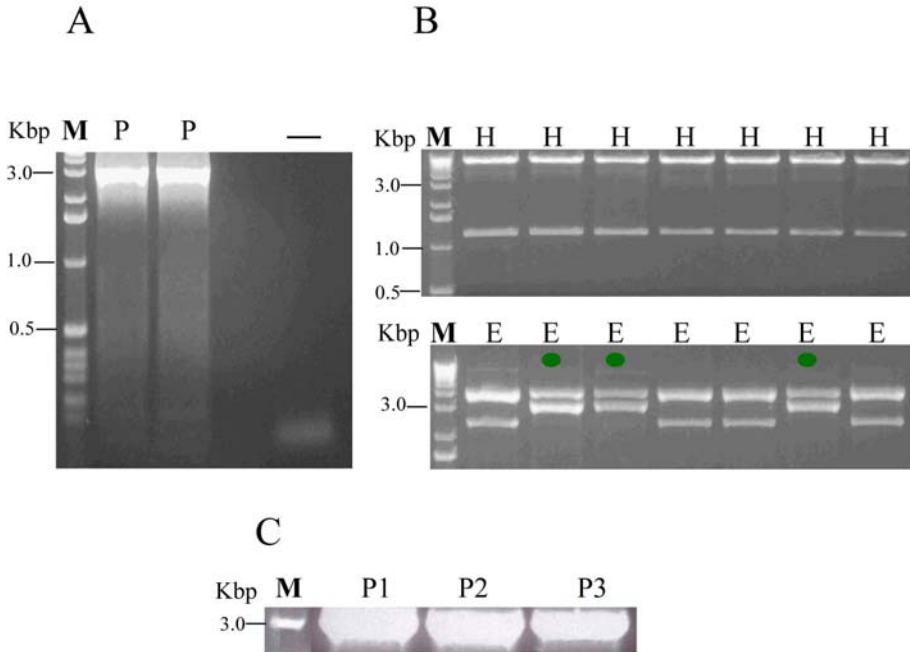


Figura 13. *Clonaggio del positivo di PCR.* (a) Clonaggio dell'oligo contenente la sequenza dell'oligo forward di screening mTG3screen2F1 all'interno del vettore mTG3esone6/7 pCR2.1- Δ HindIII. La PCR di screening mostra due colonie positive. (b) Clonaggio della cassetta contenente la neomicina e successiva digestione diagnostica con HindIII. Digestione diagnostica con l'enzima di restrizione EcoRI (E) per l'orientamento del frammento della neomicina clonato all'interno dei cloni selezionati. I cloni positivi sono rappresentati con un pallino verde. (c) PCR con la coppia di primers per l'amplificazione primaria mTG3screen2F1/mTG3RevNeoTG3-1 su differenti diluizioni (P1=1pg, P2= 10^{-1} pg e P3= 10^{-2} pg) del vettore positivo. La banda di amplificazione del positivo di PCR è attesa a 3.3 Kb.

Una prima analisi ha rilevato però un segnale di amplificazione molto debole e si è resa quindi necessaria un'ulteriore amplificazione (PCR nested) sul prodotto primario di PCR. Lo schema rappresentato in figura 14A mostra come l'oligo forward utilizzato per questa PCR secondaria sia comunque localizzato a monte della regione di ricombinazione al 5', mentre quello reverse continua ad essere posizionato all'interno della cassetta della neomicina. In figura 14B è mostrata l'amplificazione primaria e poi quella secondaria (Figura 14C) di tre cloni positivi isolati (indicato con il pallino verde). Dopo avere purificato l'amplificato del peso molecolare atteso metà è stato utilizzato per il sequenziamento del frammento e l'altra metà è stata impiegata per una serie di digestioni diagnostiche (Figura 15A) volte ad analizzare sia la corretta ricombinazione al braccio di ricombinazione al 5' che la presenza del primo sito *loxP*. Per controllare invece la presenza del secondo e del terzo sito *loxP* unitamente alla corretta formazione del secondo braccio di ricombinazione al 3' (che si deve formare subito dopo il terzo sito *loxP*) abbiamo utilizzato un'amplificazione di PCR. Quest'ultima è stata realizzata con un oligo forward localizzato a monte del secondo sito *loxP* ed uno reverse a valle del secondo braccio di ricombinazione e quindi non compreso nella regione genomica clonata all'interno del vettore. In figura 15B è possibile osservare come soltanto il clone E4 mostri l'amplificato del peso molecolare atteso. L'analisi di sequenza, condotta sull'amplificato, ha dimostrato la presenza del secondo e del terzo sito *loxP*. La PCR ed il successivo sequenziamento ha portato all'isolamento di alcuni cloni, non riportati in figura, in cui l'evento di ricombinazione era avvenuto soltanto parzialmente. Questi cloni mostravano infatti l'inserimento allelico della neomicina dopo il primo evento di crossing-over ma non del terzo sito *loxP*. Ciò si verifica soltanto se il secondo evento di crossing over, necessario per la corretta ricombinazione, avvenga a monte di tale sito piuttosto che a valle portando così al suo mancato inserimento.

4.4.4. Southern blot sul clone positivo isolato mediante PCR

La prima analisi, compiuta mediante PCR, ha portato all'isolamento di un clone positivo sui circa 400 analizzati. Su tale clone abbiamo compiuto successivamente un esperimento di Southern blot con la finalità di validare i dati preliminari ottenuti dall'analisi di PCR. Tale esperimento si rendeva necessario in quanto occorreva verificare che non fossero avvenute ulteriori eventi di ricombinazione non omologa all'interno del genoma del clone

RISULTATI

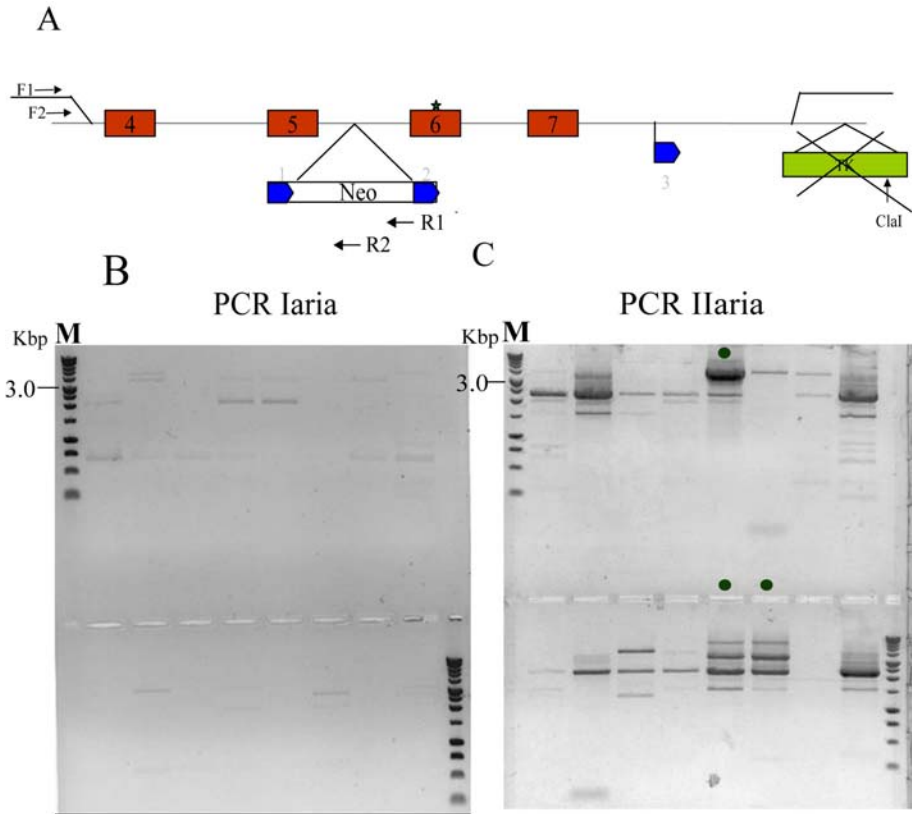


Figura 14. Schema delle amplificazioni di PCR realizzate per l'analisi delle cellule ES dopo l'elettroporazione. (a) Lo schema mostra la localizzazione delle due coppie primers sul gDNA utilizzate per l'analisi dei cloni di cellule ES dopo l'elettroporazione. La prima amplificazione è compiuta con la coppia di primers F1/R1 (F1=mTG3screen2F1; R1= mTG3RevNeoTG3-1), mentre la seconda PCR nested è compiuta con la coppia F2/R2 (F2=mTG3screen2F2; R2= mTG3neo3screen). (b) Il gel mostra l'amplificazione primaria di 16 dei 350 cloni analizzati. (c) La foto mostra la presenza di tre cloni (pallino verde) con l'amplificato del peso molecolare atteso (3475 bp).

RISULTATI

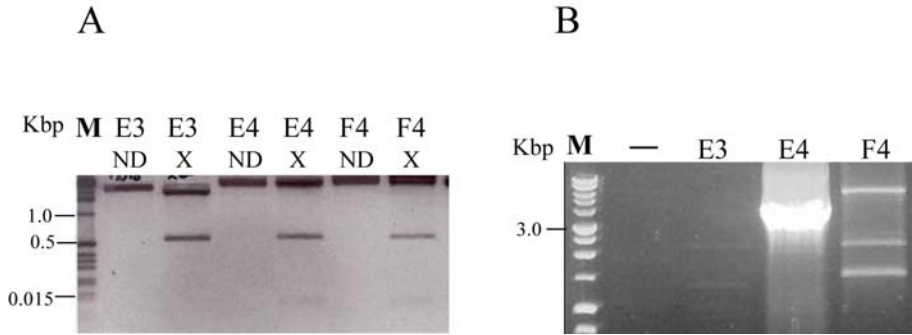


Figura 15. Selezione di un clone di cellule ES positivo per la ricombinazione omologa. (a) Dei tre cloni selezionati il clone E4 ed F4 mostra le tre bande attese dopo la digestione con l'enzima XbaI (X) (2800 +500 +100)bp. (b) L'amplificazione con la coppia di oligo mTG3screen3F2/R2 mostra come soltanto il clone E4 presenta la banda di amplificazione attesa per il controllo del braccio di ricombinazione a 3' (3.3 Kb).

RISULTATI

selezionato e ciò non può essere verificato con la PCR. L'inserimento allelico della neomicina sul gene bersaglio modifica infatti il "pattern di digestione inserendo un ulteriore sito di restrizione per l'enzima EcoRI sul gene della transglutaminasi 3. In figura 16A è mostrata l'ibridazione con una sonda gene specifica (contenente l'esone 6 e 7 con le relative regioni introniche) del DNA genomico selvatico (non elettroporato) e del clone E4, dopo digestione con EcoRI. E' possibile osservare come il campione di controllo selvatico presenti per entrambi gli alleli del gene *TGM3* la banda attesa. Il clone E4 ha invece una banda di ibridazione a più alto peso molecolare (allele selvatico) ed una a più basso peso molecolare (allele knock-out). L'evento di ricombinazione è avvenuto quindi come atteso soltanto su uno degli alleli del *TGM3*. La figura 16B mostra invece l'ibridazione del DNA genomico dei due campioni analizzati con una sonda in grado di ibridare con la neomicina. Tale controllo è molto importante poiché consente di verificare che l'inserimento della neomicina e la successiva ricombinazione siano avvenute soltanto sul gene d'interesse e non su altre regioni incognite all'interno del genoma. Il Southern blot in figura 16B evidenzia come il DNA genomico di cellule ES non elettroporate non ibridi con la sonda neomicina-specifica. Contrariamente il clone E4 mostra accanto alla banda di ibridazione attesa (4.6 Kb) altre bande, non attese, a più basso peso molecolare. Questo potrebbe essere dovuto ad ulteriori eventi di ricombinazione non desiderati, come detto sopra, oppure alla presenza di una contaminazione del DNA genomico delle cellule ES con quello dei fibroblasti "feeder" su cui sono cresciute le cellule staminali. Tali fibroblasti sono infatti resistenti alla neomicina. La figura 16C mostra come l'esperimento di Southern blot compiuto sul DNA estratto da tali fibroblasti (Mefs) e la loro successiva ibridazione con la sonda neomicina-specifica origini una delle banda a più basso peso molecolare non previste ma presenti sul DNA genomico delle cellule ES. Tale esperimento avvalorà l'ipotesi di una contaminazione da parte dei fibroblasti su cui sono cresciute le cellule ES al momento della raccolta di tali cellule staminali per le successive analisi. Resta tuttavia non del tutto chiara l'origine delle altre due bande d'ibridazione a più basso peso molecolare ma di minore intensità.

RISULTATI

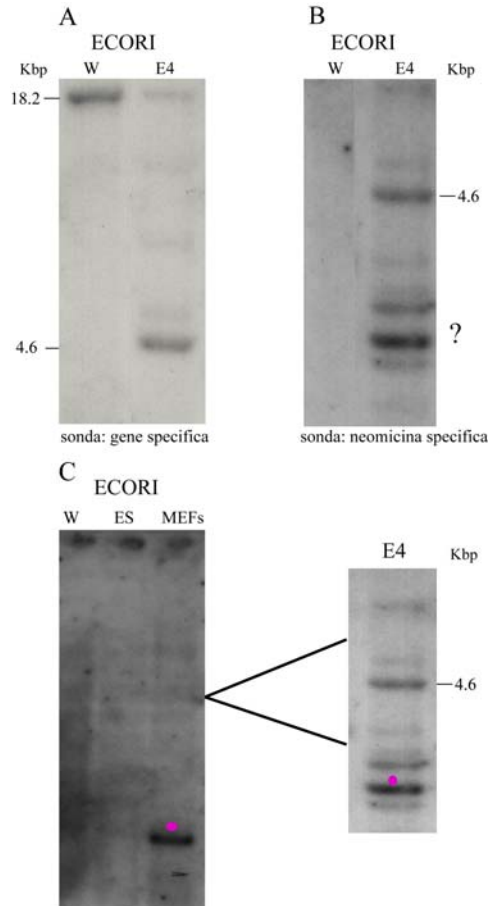


Figura 16. Southern blot per l'analisi del clone E4 di cellule ES identificato mediante PCR. (a) Il gDNA del clone E4 e quello di cellule ES non elettroporate con il vettore mTG3-KO è stato digerito con l'enzima di restrizione EcoRI e successivamente ibridato con la sonda gene-specifica (mTG3esone 6/7). Le cellule ES non elettroporate presentano entrambi gli alleli del gene *TGM3* selvatici (18.2 Kb), mentre il clone E4 mostra un allele selvatico ed un allele ko (4.6 Kb) (b) Ibridazione dei due gDNA con la sonda neomicina specifica. Soltanto il clone E4 mostra bande di ibridazione con la sonda neomicina specifica, accanto alla banda attesa (4.6 Kb) sono presenti bande a più basso peso molecolare. (c) Ibridazione con la sonda neomicina specifica con le cellule ES selvatiche ed i fibroblasti "feeder" (Mefs) su cui sono cresciute queste cellule. Le Mefs mostrano una banda di ibridazione che coincide con quella a più basso peso molecolare identificate nel clone E4.

4.4.5 Generazione delle chimere dopo l'iniezione del clone E4 su embrioni murini allo stadio di blastocisti

Il passaggio successivo per la realizzazione di topi knock-out condizionali, dopo la selezione del clone di cellule staminali positivo, prevede il trattamento di tale clone/i con la ricombinasi Cre, fornita esogenamente e la conseguente formazione dei tre differenti prodotti di ricombinazione mostrati in figura 9. Tra questi il primo prodotto è quello utilizzato per la successiva iniezione nella blastocisti. È importante notare però come il trattamento con la ricombinasi Cre ed i successivi passaggi per la selezione dei differenti prodotti possano fare perdere a queste cellule la totipotenza. Con la finalità di evitare tale evento, che avrebbe quindi compromesso il contributo di tali cellule alla formazione della chimera, abbiamo preferito iniettare il clone selezionato per la formazione delle chimere e di utilizzare la ricombinasi Cre successivamente.

Il clone selezionato (E4) è stato utilizzato quindi per la successiva iniezione su embrioni selvatici allo stadio di blastocisti con la conseguente creazione di chimere. Come è stato già precedentemente riportato le cellule staminali iniettate partecipano alla formazione di tutti gli organi e tessuti del futuro embrione. Il contributo alla formazione dell'embrione, linea somatica e germinale, da parte delle cellule ES viene solitamente valutato analizzando il colore del pelo del topo "chimera" ottenuto. Le cellule staminali contenenti l'allele modificato codificano solitamente per un colore del pelo differente da quello dell'embrione ricevente. In figura 17 sono riportate 4 chimere (3 maschi ed 1 femmina) ottenute dall'iniezione del clone E4. È possibile osservare come il pelo di tali topi presenti due differenti colorazioni: quella nera, derivante dall'embrione allo stadio di blastocisti selvatico, mentre quella marrone proveniente dal clone E4 porta l'allele del gene *TGM3* ricombinante. Le quattro chimere ottenute presentano inoltre un differente grado di colorazione nera/ marrone, in base al diverso contributo dato dal clone E4 durante la formazione dell'embrione. Tali chimere sono state reincrociate successivamente con topi selvatici (pelo nero) ottenendo prole a pelo interamente marrone (portante l'allele ricombinante) o nero (portante l'allele selvatico del gene *TGM3*) (tabella 1).

RISULTATI

Topi Nati	N°Chimera	Sesso Chimera	Topi con pelo marrone
19	1	M	19
14	2	M	3
19	3	M	3
20	4	F	0

Sui topi a pelo marrone sono in corso esperimenti di Southern blot per analizzare se l'evento di ricombinazione sia proceduto correttamente senza l'inserimento di altre copie del vettore all'interno del genoma. Il Southern blot compiuto sul DNA genomico estratto dai topi consente infatti di verificare la presenza di copie del vettore, non inserite all'interno del genoma, che potrebbero essere presenti nelle cellule ES dopo l'elettroporazione. Queste potrebbero infatti originare le bande d'ibridazione aggiuntive del clone E4, ma sarebbero perse durante la generazione del topo. Se l'analisi sulla progenie delle chimere validerà la corretta ricombinazione del clone selezionato (E4), i topi con pelo marrone saranno incrociati con topi esprimenti la ricombinasi Cre ubiquitariamente. Alla generazione successiva sarà quindi possibile ottenere topi contenenti rispettivamente ognuna delle tre combinazioni genetiche mostrate in figura 9B. I topi che presenteranno un allele delle TGasi 3 come quello schematizzato in figura 9B (ricombinazione tra il primo ed il secondo sito *loxP*) saranno incrociati tra loro per la creazione di una progenie in cui gli esoni 6 e 7 di entrambi gli alleli del gene *TGM3* risultino essere posizionati tra due ripetizioni dirette dei siti *loxP*. L'incrocio successivo di tali animali con quelli esprimenti la ricombinasi Cre sotto un promotore tessuto-specifico (nel nostro caso pelle-specifico come quello di una cheratina) consentirà di ottenere alla generazione successiva topi in cui è stata selettivamente inattivata l'espressione della TGasi 3 nelle pelle.

A



Chimera 1: maschio



Chimera 2: maschio



Chimera 3: maschio



Chimera 4: femmina

Figura 17. *Generazione delle chimere dall'iniezione nella blastocisti del clone E4.* Tre chimere di sesso maschile ed una di sesso femminile sono riportate in figura. E' possibile osservare come il pelo presenti una duplice colorazione: marrone (derivante dalle cellule ES del clone E4) e nero (derivante dalle cellule selvatiche dell'embrione ricevente).

4.5 Clonaggio di parte del DNA genomico del gene *TGM3* in un nuovo vettore per la ricombinazione omologa

I dati precedentemente mostrati hanno evidenziato come il vettore da noi utilizzato ricombinasse soltanto parzialmente all'interno del gene *TGM3*. Ciò determinava l'estrusione del terzo sito *loxP* in gran parte dei cloni analizzati riducendo così il numero degli eventuali cloni positivi. Nel nostro caso è stato possibile identificare soltanto un putativo clone positivo. Questo evento potrebbe essere causato da un contenuto non sufficiente di DNA genomico (1.2 Kb) TGasi 3 specifico clonato a valle del terzo sito *loxP*. Il secondo evento di crossing-over avverrebbe così a monte e non a valle del terzo sito *loxP*. Con la finalità di evitare tale inconveniente e avendo a disposizione un'ulteriore ciclo di elettroporazione abbiamo deciso di clonare la regione del DNA genomico del gene *TGM3* in un vettore per la ricombinazione di nuova generazione.

4.5.1 Descrizione del vettore prescelto per la realizzazione di topi TG3 knock-out condizionali

Lo schema del vettore da noi utilizzato è riportato in figura 18A. E' possibile notare come il vettore pFRL1 contenga già clonati al suo interno sia il marcatore di selezione positiva (*neo*) che quello negativo (*tk*). Il marcatore di selezione positivo presenta alla sua estremità due siti *Frt*, mentre la regione di DNA genomico che si vuole eliminare è compresa tra due siti *loxP*. Questo consente l'excisione specifica della cassetta della neomicina dopo l'azione della ricombinasi FLP derivante dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Quest'ultima appartiene alla famiglia delle integrasi-ricombinasi sito-specifiche ma deriva dal lievito. La ricombinasi Cre riconosce invece i siti *loxP* e quindi il separato utilizzo delle due ricombinasi consente di excidere specificatamente la cassetta della neomicina o la regione del DNA bersaglio evitando così di ottenere la serie dei tre differenti prodotti originati dalla presenza di tre siti *loxP*.

4.5.2 Clonaggio di una porzione del gene *TGM3* all'interno di pFRLT1

Utilizzando il sito NotI/SalI abbiamo inserito la regione di DNA genomico contenente gli esoni 4 e 5 con le relative regioni introniche circostanti. Per esigenze di clonaggio il frammento è stato clonato prima TA nel vettore pGemT-Easy e successivamente è stato inserito nel vettore di destinazione finale pFRLT1. La figura 18B mostra l'isolamento di cloni positivi indicati con il pallino verde. Quelli con il pallino rosso contengono il frammento d'interesse clonato nel pGemT-Easy. Ciò potrebbe essere causato da una piccola contaminazione al momento del clonaggio di tale vettore che essendo più piccolo sequestra il frammento prescelto a svantaggio del più grande vettore pFRLT1 (circa 8Kb). Successivamente abbiamo inserito la cassetta della neomicina nel vettore di destinazione finale utilizzando il sito unico restrizione per l'enzima BamHI. Dopo avere selezionato due colonie positive (figura 18C) abbiamo verificato con un'ulteriore digestione il corretto orientamento del frammento clonato come mostrato in figura 18D. Il clonaggio della regione intronica a valle dell'esone 6 e 7 del gene della *TGasi 3* è stato realizzato utilizzando il sito unico di restrizione BstBI. Il frammento è stato inizialmente clonato TA in pGemT-Easy (19A) ed è stato poi successivamente exciso per essere clonato nel vettore di destinazione finale pFRLT1. Il clonaggio e la selezione di due colonie positive sono mostrati in figura 19B. Le due colonie selezionate (indicate con il pallino verde) mostrano un'orientamento senso dell'inserto mentre l'altra quello anti-senso (Figura 19C). Il vettore è stato successivamente utilizzato per l'elettroporazione in cellule ES. Il DNA genomico è stato quindi utilizzato per l'analisi mediante Southern blot attualmente in corso. La lunghezza dei frammenti clonati, sia del braccio di ricombinazione al 5' che quello al 3', impedisce la realizzazione di una prima analisi dei cloni mediante PCR come era stato fatto in precedenza. Non è stato infatti possibile trovare una coppia di primers che mostrasse una buona sensibilità nell'amplificazione neanche nel vettore da noi utilizzato come positivo di PCR.

RISULTATI

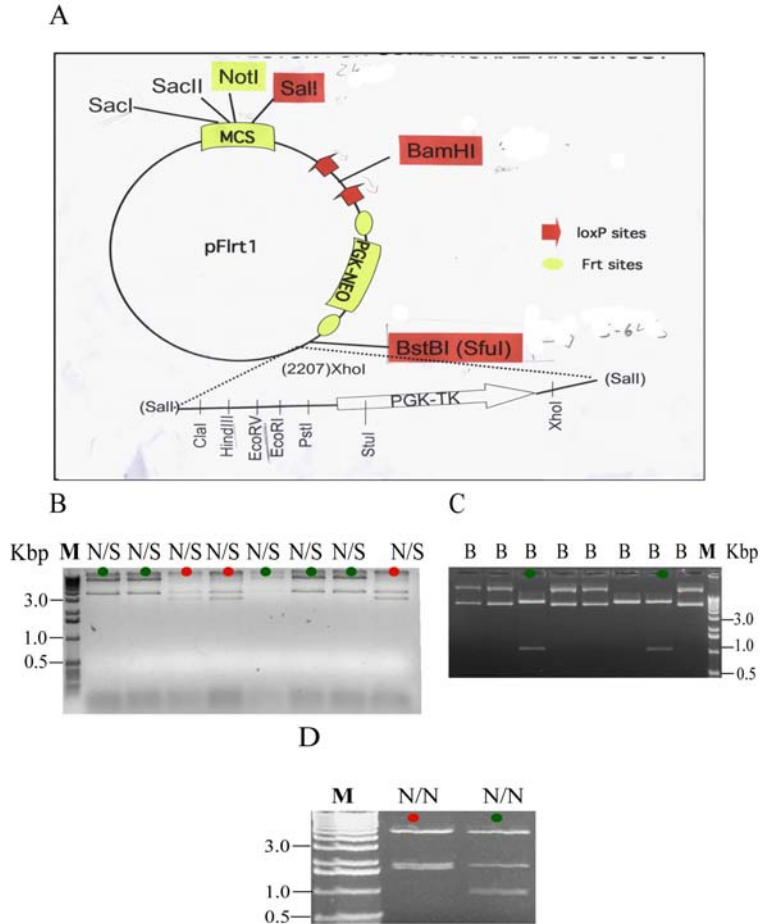


Figura 18. Realizzazione di un nuovo vettore per la creazione di topi knock-out condizionali per il gene *TGM3*. (a) Schema del vettore pFRL1. (b) Clonaggio del braccio di ricombinazione a 5' (circa 5Kb) all'interno del vettore pGemT-Easy e successivo clonaggio in pFRLT1. L'analisi delle colonie è realizzata mediante la doppia digestione con gli enzimi NotI/Sall (N/S). Le colonie con l'inserto sono evidenziate dal pallino verde. Il pallino rosso mostra le colonie che prestano il frammento di ricombinazione al 5' clonato in pGemT-Easy e non nel vettore di destinazione finale pFRLT1. (c) Clonaggio del gDNA contenente l'esone 6 e 7 (1.1 Kb) con i relativi introni e analisi delle colonie con digestione BamHI (B). Le due colonie positive sono evidenziate con il pallino verde. (d) Le due colonie selezionate mostrano una l'orientamento senso (pallino verde) e l'altra l'orientamento anti-senso (pallino rosso) dopo la doppia digestione con gli enzimi NotI/NcoI (N/N).

RISULTATI

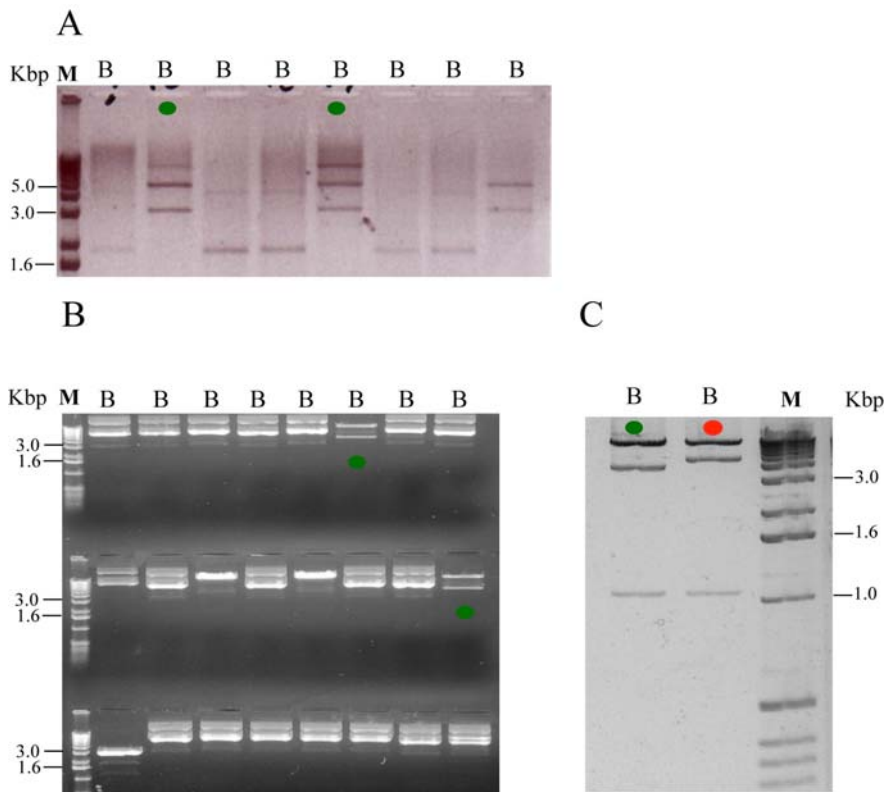


Figura 19. *Clonaggio del braccio di ricombinazione al 3' in pFRTL1.* (a) Clonaggio del frammento al 3' (4.7 Kb) all'interno di pGemT-Easy. Le colonie positive dopo digestione con BstBI (B) sono evidenziate dal pallino verde. (b) Inserimento del braccio al 3' di ricombinazione all'interno di pFRTL1. Le tre colonie positive, dopo digestione con BstBI, sono evidenziate con il pallino verde. Il pallino rosso mostra colonie che presentano la regione al 3' clonata in pGemT-Easy. (c) La digestione diagnostica con l'enzima BamHI (B) mostra una colonia con il frammento clonato nel corretto orientamento (pallino verde), mentre nell'altra l'inserito è nell'orientamento anti-senso (pallino rosso).

4.5 *Scotin*: un nuovo gene “target” di p63 espresso durante il differenziamento epidermico

Scotin è stato precedentemente isolato come un gene pro-apoptotico indotto da p53 la cui espressione risulta essere localizzata nel reticolo endoplasmatico (RE) e nella membrana nucleare (Bourdon et al., 2002). *Scotin* induce inoltre apoptosi indipendentemente da p53 in risposta a stimoli di “stress” provenienti dal RE. Un altro membro pro-apoptotico della famiglia di p53 ossia p73 è inoltre in grado di regolare l’espressione di *Scotin* durante l’evento apoptotico come precedentemente riportato nell’introduzione. Questi dati pubblicati in precedenza ci hanno indotto quindi ad investigare sulla capacità di p63 di regolare l’espressione di *Scotin*. Come è stato precedentemente descritto p63, altro membro della famiglia di p53, svolge un ruolo chiave durante il differenziamento epidermico.

4.6.1. L’espressione esogena di *Scotin* induce quella di GADD153

Come è riportato in Figura 20 l’espressione esogena di *Scotin* nella linea cellulare Saos-2 è capace di indurre di GADD153, un fattore trascrizionale che regola la trascrizione di molti geni indotti in risposta allo stress del reticolo. E’ possibile notare come GADD153 è indotto sia trascrizionalmente che a livello proteico da *Scotin*, confermando così la capacità di quest’ultimo gene di indurre “stress” del reticolo.

4.6.2 p63 è in grado di regolare trascrizionalmente *Scotin*

Utilizzando le linee cellulari inducibili Saos-2, in grado di esprimere selettivamente TAp63 o Δ Np63 dopo induzione con doxiciplina, abbiamo analizzato la capacità di p63 di regolare l’espressione di *Scotin*. Questa linea cellulare (osteosarcoma) non esprime p53 mentre p63 endogeno è debolmente rilevabile soltanto attraverso PCR. Esperimenti di RT-PCR quantitativa preliminari hanno evidenziato la capacità per TAp63 di regolare positivamente l’espressione di *Scotin*, mentre Δ Np63 sembrerebbe inibire l’espressione di tale gene (Fig. 21A). Le linee inducibili per p53 e TAp73

RISULTATI

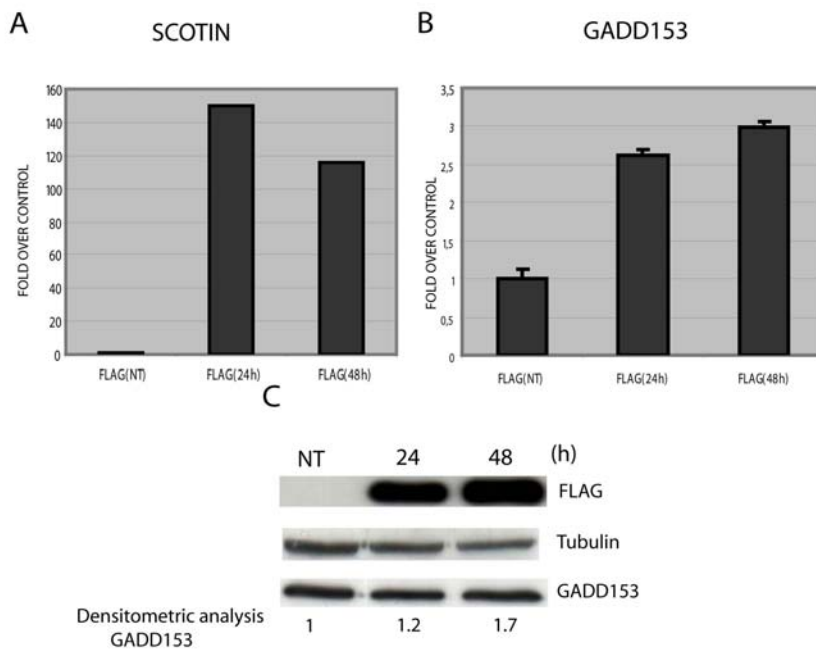


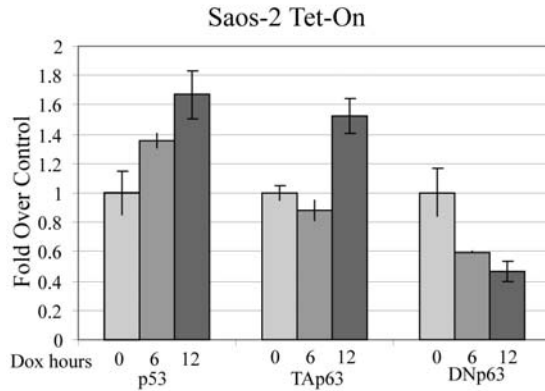
Figura 20. *L'overespressione di Scotin induce lo stress del reticolo endoplasmatico.* (a) Scotin è stato trasfettato nella linea cellulare Saos-2 cells (24h and 48h). RTqPCR dimostrano che la sovra-espressione di Scotin induce GADD153. (b) *GADD153* è espresso almeno tre volte di più rispetto il controllo non trasfettato dopo 48h. (c) Il Western blot compiuto sui lisati di cellule Saos-2 trasfettate con Scotin (ScotinFLAG) mostra l'induzione di GADD153 a livello proteico. L'analisi densitometrica mostra come GADD153 è indotto almeno del 70% dopo la trasfezione di Scotin. La tubulina è utilizzata come controllo del caricamento.

sono state utilizzate come controllo positivo. Questi dati sono stati confermati successivamente da immunofluorescenze compiute su cellule Saos-2 non inducibili transfettate con TAp63. Come mostrato in figura 21B le cellule positive per p63 (verde) mostrano una chiara espressione di Scotin (rosso), come aggregati localizzati nel reticolo endoplasmatico. Ciò indica la presenza di “stress” del reticolo endoplasmatico. Scotin è invece espresso diffusamente nel citoplasma delle cellule non transfettate. La trasfezione delle Saos-2 con Δ Np63 non produce invece variazioni sull’espressione del nostro gene d’interesse. La presenza di “stress” del reticolo può essere ulteriormente valutata attraverso l’espressione di GADD153. In figura 22 è possibile osservare come soltanto le cellule Saos-2 positive per la trasfezione di TAp63 (verde) mostrino una chiara colorazione nucleare per GADD153 (rosso).

4.6.3 Espressione di Scotin e GADD153 nella linea cellulare HaCat

I dati mostrati precedentemente avvalorano l’ipotesi dell’induzione dello stress del reticolo endoplasmatico, mediata da Scotin. Quest’ultimo sarebbe poi attivato a sua volta dall’isoforma TA di p63. Con la finalità di validare tale ipotesi abbiamo analizzato l’espressione di Scotin e GADD153 in una linea epiteliale immortalizzata (HaCat), dove è espresso p63 a livello endogeno. Tali cellule sono state indotte a differenziare come mostra l’aumento dell’espressione della cheratina 10 paragonato alla tubulina e riportato in figura 23A. Esperimenti di RT-PCR quantitativa condotti sulle cellule in differenziamento (0, 4, e 6 giorni) hanno evidenziato come TAp63 (Figura 23B) aumenti la propria espressione durante il differenziamento contrariamente a Δ Np63. L’induzione di TAp63 è a sua volta accompagnata da un’aumento, a livello trascrizionale, di Scotin (Figura 23C) e GADD153 (Figura 23D). Quest’ultimo raddoppia la propria espressione al sesto giorno di differenziamento. Immunofluorescenze condotte su HaCat differenzianti hanno evidenziato come durante questo processo vi sia una rilocalizzazione nucleare nell’espressione di GADD153 (Figura 24). L’aumento nell’espressione del marcatore loricrina, conferma il procedere del differenziamento nella linea cellulare utilizzata per l’analisi.

A



B

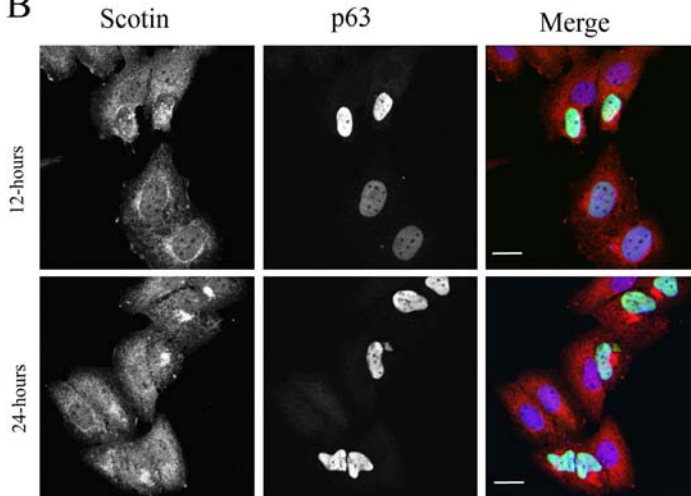


Figura 21. *TAp63 α* induce l'espressione di *Scotin*. (a) La linea cellulare Saos-2, stabilmente trasfettata con i vettori doxiciclina-inducibili contenenti p53, TAp63 α or Δ Np63 α , viene indotta con la doxiciclina per 6h e 12h. RTqPCR mostrano che l'espressione di p53 e TAp63 α , non di Δ Np63 α , induce *Scotin*. (b) Cellule Saos-2 dopo essere state trasfettate (12h e 24h) con vettori di espressione per TAp63 vengono colorate per l'immunofluorescenza per p63 (verde) e Scotin (rosso). Nelle cellule trasfettate con TAp63, Scotin si accumula nell'area peri-nucleare (Golgi o reticolo endoplasmatico). Contrariamente cellule p63 $^{-/-}$ mostrano una diffusa colorazione citoplasmatica per Scotin. Bar=20 μ m.

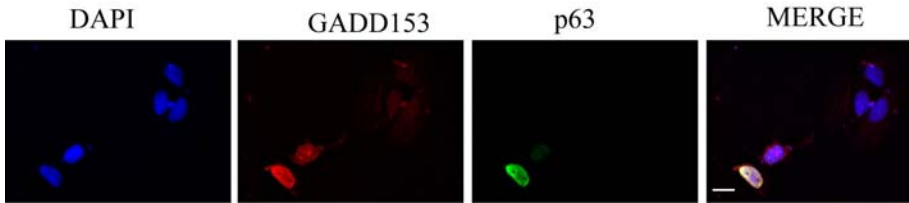


Figura 22. L'espressione di *Tap63α* induce *GADD153*. La linea cellulare trasfettata con il vettore di espressione pCDNA-HA *Tap63α* mostra che le cellule positive per p63 (verde) esprimono *GADD153* (rosso) ed inoltre le due proteine co-localizzano. Bar=20 μ m

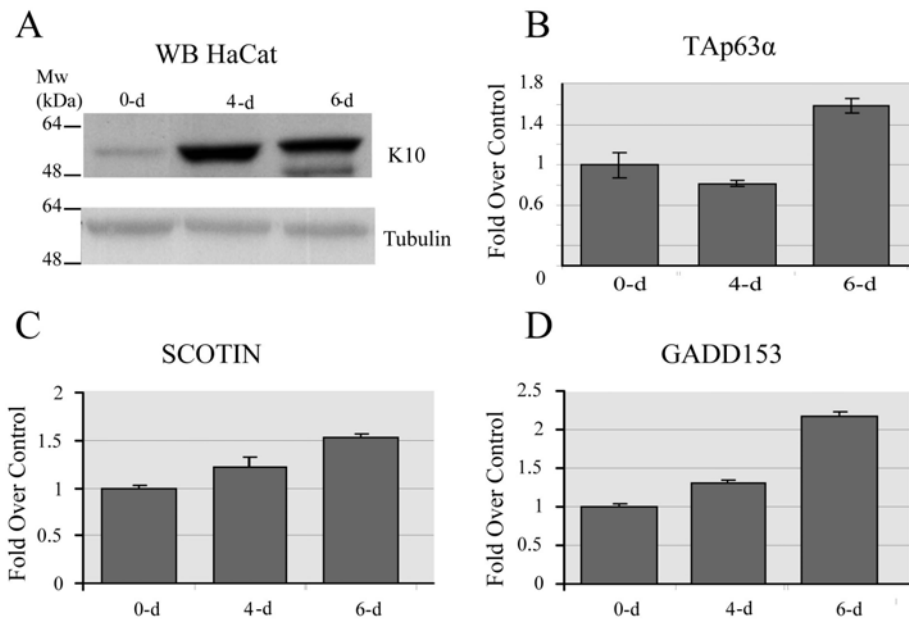


Figura 23. Espressione di *Scotin* e *GADD153* nella linea cellulare *HaCat*. (a) Le *HaCat* sono state indotte a differenziare (1.2 mM Ca^{++} e 0.1% FBS) per 0, 4 e 6 giorni. Il Western blot mostra un incremento nell'espressione della cheratina 10, marcatore del differenziamento, paragonato alla tubulina. (b) L'RNA estratto dalle *HaCat* in differenziamento è stato retrotrascritto ed utilizzato per esperimenti di RT-PCR quantitativa. Durante il differenziamento *Tap63α* è indotto a livello trascrizionale insieme a *Scotin* (c) e a *GADD153* (d). Quest'ultimo raddoppia la propria espressione durante il differenziamento.

4.6.4 Scotin è espresso nell'epidermide di topi selvatici

Con la finalità di analizzare in quale strato dell'epidermide fosse localizzata l'espressione di Scotin abbiamo condotto immunofluorescenze su sezioni di topi selvatici appena nati. La pelle di questi topi è infatti senza peli, ma l'epidermide è completamente formata dimostrandosi così un ottimo modello di studio. I risultati delle immunofluorescenze riportate in figura 25A mostrano come Scotin (rosso) sia espresso negli strati sopra-basali dell'epidermide (dove TAp63 è presente), ma non nello strato basale dove è espresso Δ Np63 (verde). Nell'immunofluorescenza abbiamo utilizzato un anticorpo anti-pan p63 (TA e Δ N), ma è necessario sottolineare che Δ Np63 rappresenta circa il 99% dell'espressione totale di p63 nella pelle di conseguenza TAp63 non è rilevabile. Western blots condotti su estratti di cheratinociti murini, prelevati da topi selvatici appena nati ed indotti a differenziare *ex vivo* hanno evidenziato un forte aumento nell'espressione di Scotin durante il differenziamento epidermico (Fig. 25B). E' possibile rilevare, come atteso, una diminuzione nell'espressione di Δ Np63 durante il differenziamento (Fig.25B). L'aumento nell'espressione della loricina, un marcatore del differenziamento, è riportato invece in figura 25C. La tubulina è stata riportata come controllo di caricamento del gel.

4.6.5 Analisi dell'espressione di Scotin in una linea epiteliale umana

I dati relativi all'induzione di Scotin durante il differenziamento epidermico di cheratinociti murini ci hanno indotto ad analizzare l'espressione di tale gene anche nell'uomo. A tale scopo ci siamo avvalsi dell'utilizzo di una linea primaria epiteliale (NHEK) indotta a differenziare *in vitro*. Analisi di RT-PCR quantitativa hanno mostrato come Scotin raddoppi la propria espressione dopo cinque giorni di differenziamento (Fig. 26A). Questo aumento è accompagnato da un'incremento nell'espressione di TAp63 (Fig.26B) e da una riduzione di Δ Np63 (Fig. 26C). I Western blots riportati in figura 25E e condotti su lisati proteici di NHEK in differenziamento mostrano circa un 50% di induzione nell'espressione di Scotin. A ciò si accompagna una riduzione a livello proteico di Δ Np63 ed un incremento della cheratina 10, importante marcatore che aumenta la propria espressione durante il differenziamento (Fig.26D). L'induzione di Scotin nelle NHEK è tuttavia meno evidente rispetto a quella osservata nei cheratinociti murini, ma ciò può essere facilmente spiegato se si considera

RISULTATI

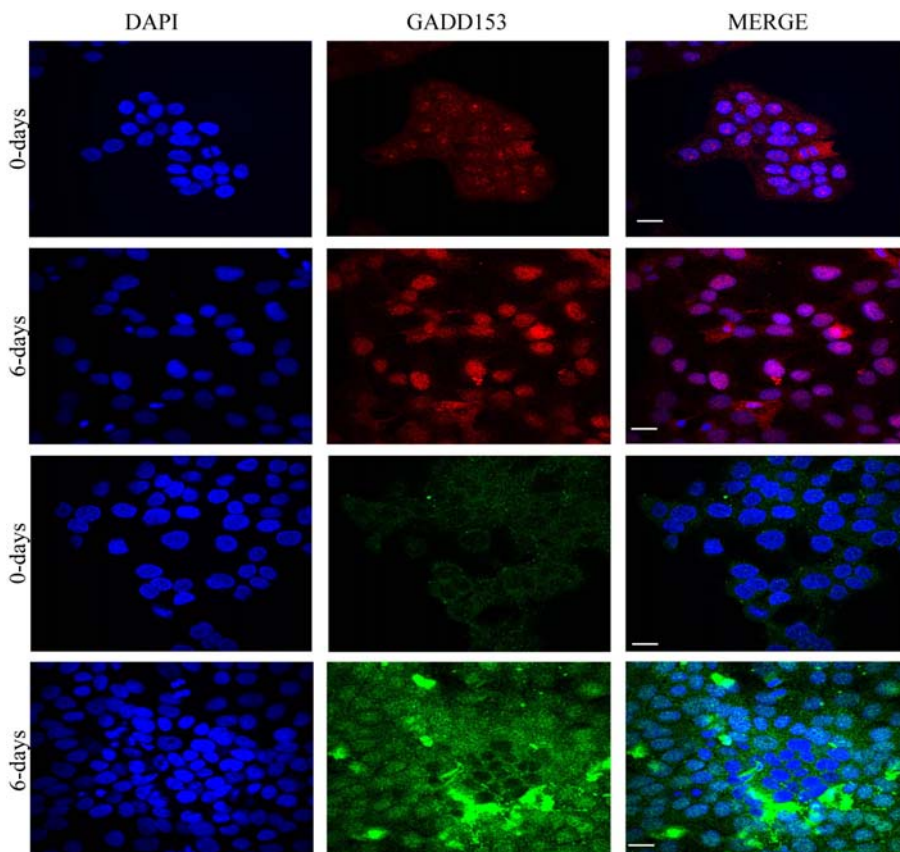


Figura 24. *L'espressione di GADD153 è indotta nelle HaCat in differenziamento.* Durante il differenziamento cellulare (da 0 a 6 giorni) è possibile osservare una chiara localizzazione nucleare nell'espressione di GADD153. La loricrina (verde), marcatore del differenziamento, aumenta anch'essa la propria espressione da 0 a 6 giorni.

RISULTATI

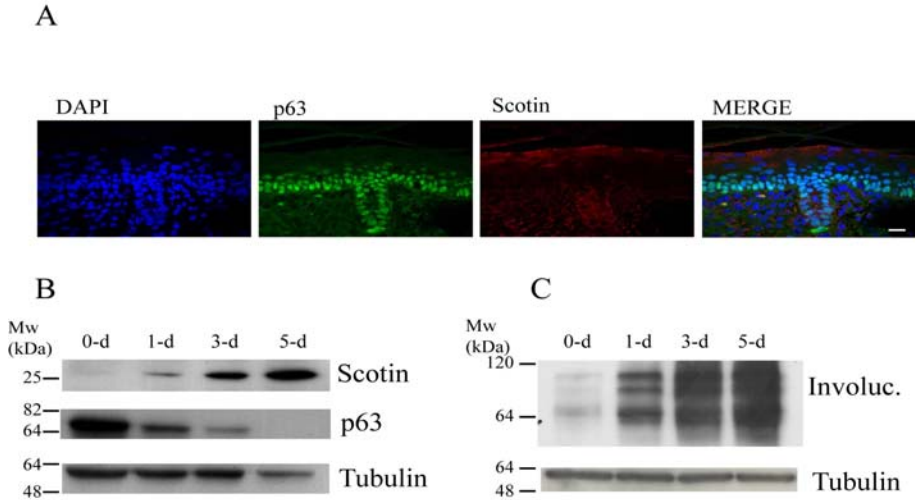


Figura 25. *L'espressione di Scotin aumenta durante il differenziamento di cheratinociti murini.* (a) Immunofluorescenze condotte su sezioni di pelle di topi selvatici appena nati dimostra che Scotin (rosso) è espresso nello strato sopra-basale dell'epidermide, ma non in quello basale dove $\Delta Np63\alpha$ (verde) è ampiamente espressa. (b) Western blots condotti su lisati di cheratinociti murini, indotti a differenziare *ex vivo*, rivelano un aumento nell'espressione di Scotin durante il differenziamento. Contrariamente $\Delta Np63$ riduce la sua espressione. La tubulina è utilizzata come controllo del caricamento. (c) L'involucrina, un marker di differenziamento, aumenta la sua espressione nei cheratinociti murini. Bar=20 μ m

RISULTATI

l'espressione di Δ Np63. Quest'ultima riduce infatti più lentamente la propria espressione nelle NHEK rispetto ai cheratinociti murini in differenziamento. Ciò potrebbe diminuire il grado d'induzione di Scotin, poiché come è stato già mostrato in figura 21A l'espressione di Δ Np63 inibisce quella di Scotin. Tutti questi dati avvalorano la nostra ipotesi riguardante l'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico durante il differenziamento. Tale stress sarebbe causato dall'aumento dell'espressione di Scotin, la cui trascrizione è regolata a sua volta dall'isoforma TA di p63.

RISULTATI

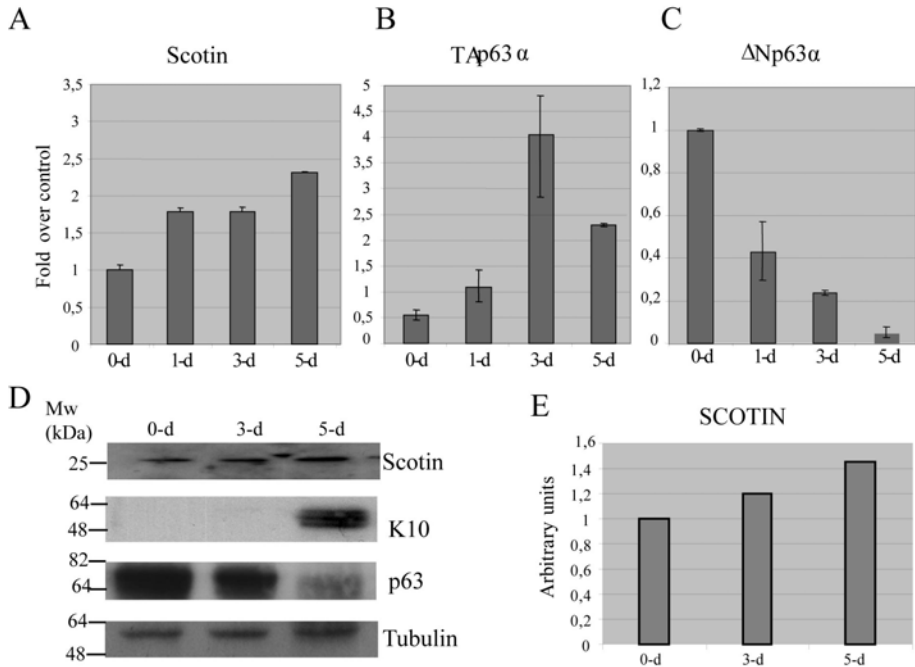


Figura 26. Espressione di Scotin nella linea cellulare NHEK. (a) Esperimenti di RT-PCR quantitativa condotti su NHEK indotte a differenziare (1.2 mM Ca⁺⁺) dimostrano che *Scotin* raddoppia la sua espressione, a livello trascrizionale, durante il differenziamento. (b). *Tap63α* aumenta invece la sua espressione contrariamente a (c) *ΔNp63α*. (d) Western blots condotti su lisati di NHEK mostrano che Scotin è indotto al giorno 3 e 5 del differenziamento. Questo è accompagnato dalla diminuzione di *ΔNp63* e dall'aumento dell'espressione della cheratina 10. (e) La densitometria evidenzia come Scotin aumenti la sua espressione di circa il 50% nelle NHEK in differenziamento.

DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi è focalizzato sull'analisi del complesso meccanismo che regola la formazione dell'involucro corneo con la finalità di acquisire nuove conoscenze sul ruolo svolto sia dalla transglutaminasi 3 che di p63. Per quanto riguarda il primo gene esso appartiene alla famiglia delle transglutaminasi. Questi enzimi catalizzano la reazione di trasferimento acilico Ca^{2+} -dipendente tra un gruppo γ -carbrossiamidico di una glutamina e il gruppo ϵ -aminico di una lisina. Tale modifica post-traduzionale porta alla formazione di legami ϵ -(- γ -glutamil)lisina con conseguente oligomerizzazione delle proteine substrato che compongono parte dell'involucro corneo, come la loricrina, l'involucrina o le piccole proteine ricche in prolina, mediante la formazione di un legame iso-peptidico. Quattro sono le TGasi la cui espressione è localizzata nelle pelle (TGasi 1, TGasi 2, TGasi 3, TGasi 5) e queste presentano una specificità di espressione nei diversi strati dell'epidermide. La TGasi 2 risulta essere espressa a livello dello strato basale, la TGasi 1 in quello spinoso e granuloso, la TGasi 3 nello strato sopra-granuloso mentre la TGasi 5 mostra un gradiente di espressione dallo strato spinoso a quello granuloso (Candi et al., 2002). Tale specificità di espressione unita alla ridondanza nel numero dei geni codificanti per i membri di tale famiglia porta ad ipotizzare che le differenti TGasi vengano attivate con un differente ordine temporale durante il differenziamento epidermico. Ciò è avvalorato da esperimenti condotti *in vitro* (Candi et al., 2001) che evidenziano come questi enzimi riconoscano differenti residui di glutamina e di lisina sulla stessa proteina bersaglio. Con la finalità di chiarire il ruolo svolto dalla TGasi 3 durante il differenziamento epidermico abbiamo deciso di creare topi knock-out condizionali per questo enzima utilizzando il sistema della ricombinasi Cre e dei siti *loxP*. Questo sistema che è presente in natura nel batteriofago P1, consente infatti di inattivare l'espressione del gene bersaglio in maniera tessuto-specifica. La scelta di intraprendere questo percorso, sicuramente più lungo e complesso rispetto alla creazione di topi knock-out non condizionali, è giustificata dall'analisi di alcuni dati preliminari unitamente a quelli già presenti in letteratura. Come è stato già precedentemente mostrato nei risultati di questa tesi la TGasi 3 risulta non essere espressa soltanto nella pelle, ma il suo trascritto è presente anche nel cervello e nello stomaco di topi selvatici. L'inattivazione in tutti i tessuti del gene *TGM3* potrebbe quindi comportare dei problemi a livello di sviluppo dell'embrione murino geneticamente modificato compromettendo così la creazione di topi *TGM3*^{-/-}. La specifica ablazione della TGasi 3 nella pelle consente invece di analizzare il fenotipo dei topi ottenuti senza modificare l'espressione di tale gene in altri tessuti.

Con la finalità di creare tali topi abbiamo generato un costrutto (pmTG3-cKO) da utilizzare per l'elettroporazione delle cellule staminali murine. La peculiarità del costrutto da noi realizzato consiste nel fatto che tale vettore consente di ottenere tre differenti prodotti dopo l'azione costitutiva della ricombinasi Cre (Fig.9B risultati). E' possibile notare come accanto alla produzione del primo prodotto di ricombinazione, in cui è stata posta soltanto la regione da eliminare tra due siti *loxP*, gli altri due terzi di prodotti presentano il gene della TGasi 3 interrotto con perdita della cisteina catalitica. L'iniezione in embrioni allo stadio di blastocisti del primo prodotto consente di ottenere topo knock-out condizionali, mentre l'iniezione degli altri due prodotti consente di realizzare anche dei knock-out totali. Sarà quindi possibile analizzare, percorrendo parallelamente le due vie, il fenotipo prodotto dall'eliminazione totale dell'espressione della TGasi 3 o di quella tessuto-specifica. Come è stato già precedentemente riportato nei risultati di questo lavoro di tesi siamo attualmente arrivati alla creazione dei topi "chimera" ed all'analisi della loro progenie per convalidare l'effettiva positività del clone precedentemente isolato. La scarsa resa nell'isolamento dei cloni positivi ci ha indotto però ad utilizzare un nuovo vettore per una successiva elettroporazione. Analisi di sequenziamento condotte sui cloni elettroporati hanno rilevato infatti come tale scarsità nell'isolamento di cloni che presentavano un evento di ricombinazione completo e non soltanto parziale, fosse dovuta alla formazione del secondo evento di crossing-over non a valle ma a monte del terzo sito *loxP*. Ciò potrebbe essere causato da un contenuto di DNA clonato nel vettore a valle di tale sito non sufficiente per la ricombinazione omologa. Per quanto riguarda invece il vettore di nuova generazione da noi utilizzato è possibile osservare come la presenza dei siti *loxP* unitamente a quelli FRP consenta una più rapida selezione dei cloni ricombinanti. Attualmente dopo avere clonato le regioni di DNA genomico da utilizzare per la ricombinazione omologa stiamo analizzando i cloni elettroporati per la creazione di topi TGasi 3 knock-out condizionali. Nel nostro laboratorio sono già presenti topi knock-out per la TGasi 1 e TGasi 2 (realizzati dal nostro gruppo) quindi l'ottenimento dei topi *TGM3*^{-/-} ci consentirà di realizzare sia doppi knock-out, nelle possibili combinazioni, che tripli knock-out in cui analizzare specificatamente il ruolo svolto dalla TGasi3 durante la formazione dell'involucro corneo. La ridondanza nei membri della famiglia delle TGasi potrebbe infatti causare anche l'assenza di alterazioni a livello epidermico nei knock-out della TGasi 3, ma la realizzazione dei doppi e tripli knock-out consentirà invece di analizzare meglio l'eventuale attività compensatoria svolta da tali enzimi. Il reincrocio

dei topi con TGasi 3 knock-out condizionali con topi esprimenti la ricombinasi Cre sotto il controllo di promotori appartenenti a geni espressi specificatamente durante lo sviluppo del cervello ci permetterà inoltre di approfondire l'eventuale ruolo svolto dalla TGasi 3 in questo importantissimo organo. Sempre in questo lavoro di tesi, volto a comprendere il ruolo svolto dalla TGasi 3 nella pelle, abbiamo condotto studi sul trascritto codificato da tale gene che hanno portato all'isolamento di nuove varianti di splicing per la transglutaminasi 3 murina ed umana. La variante $\Delta 6\Delta 7$ isolata nel topo risulta non possedere né l'attività transamidasica, poiché priva della cisteina catalitica, né quella GTPasica in quanto risultano essere assenti una serie di residui importanti per il legame del GTP (Zocchi et al., 2007). Nella variante di splicing isolata nell'uomo $\Delta 9\Delta 10$ è conservato invece il corretto schema di lettura, ma l'attività GTPasica risulta essere ugualmente compromessa, poiché sono assenti residui che partecipano al legame del GTP. Per quanto riguarda invece l'attività di "cross-linking" quest'ultima isoforma presenta un'inalterata struttura della triade catalitica, ma il secondo sito di legame per il Ca^{2+} , importante per l'attivazione dell'enzima, risulta essere perso. Mediante saggi di attività abbiamo osservato come la variante $\Delta 9\Delta 10$ sia meno attiva della corrispondente forma selvatica ed inoltre come l'espressione di tale variante non cambi in pazienti sani o affetti da ittiosi lamellare. La TGasi 3 come per la TGasi 1 risulta essere inoltre attivata mediante taglio proteolitico da una proteasi non nota. E' stato recentemente pubblicato da Cheng et al., che la catepsina L attiva *in vitro* il pro-enzima della TGasi 3. I dati relativi alla bassa attività transamidasica dell'isoforma $\Delta 9\Delta 10$ potrebbero essere quindi giustificati dal fatto che questa variante manchi del sito di taglio riconosciuto dalla proteasi attivatrice. Queste isoforme sembrano quindi non possedere una funzione fisiologica, ma la loro presenza non può essere attribuita ad errori nel meccanismo che regola lo "splicing" e quindi la maturazione del trascritto della TGasi 3. La bassa frequenza di tali errori non giustificherebbe infatti la presenza di varianti di splicing anche per la TGasi 1, TGasi 2 e TGasi 5. Tale evento potrebbe invece essere causato all'alto grado di omologia di sequenza e di organizzazione genica (Grenard et al., 2001) all'interno dei membri di tale famiglia.

Nella seconda parte di questo lavoro di tesi abbiamo invece analizzato il ruolo di Scotin, un nuovo gene indotto da p63 durante il differenziamento. Come è stato infatti già precedentemente descritto p63 svolge un ruolo fondamentale durante lo sviluppo epidermico. Questo gene è trascritto, grazie alla presenza di due differenti promotori, in due differenti

isoforme:TA e ΔN . L'isoforma ΔN manca del dominio di trans-attivazione di conseguenza mentre TA è considerata l'attivatore trascrizionale ΔN potrebbe svolgere un ruolo da dominante negativo. La funzione determinante di p63 nello sviluppo degli epitelii stratificati è nota sin dal 1999, quando due modelli murini, nulli per p63, hanno evidenziato come in questi animali, lo sviluppo degli epitelii pluristratificati, oltre che degli arti e degli annessi cutanei, sia fortemente compromesso (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Nel nostro laboratorio è stato recentemente dimostrato, mediante complementazione genetica di topi p63^{-/-} con TA, ΔN o entrambi, come soltanto i topi ΔN ma ancor di più quelli con doppia complementazione (TA e ΔN) mostrino grandi aree di differenziamento nella pelle (Candi et al., 2006). $\Delta Np63$ rappresenta circa il 99% dell'espressione totale di p63 nella pelle. La sua espressione è localizzata nello strato basale dell'epidermide dove svolgerebbe un'attività pro-proliferante sulle cellule staminali embrionali epidermiche che risiedono nello strato basale. TAp63 sembrerebbe promuovere il differenziamento agendo sinergicamente o conseguentemente a $\Delta Np63$. È stato recentemente pubblicato come TAp63 svolga un ruolo importante nel garantire il differenziamento dei cheratinociti epidermici attraverso l'induzione del fattore di differenziamento e di crescita 15 (GDF15) (Ichikawa et al., 2007). La sua espressione nella pelle, rilevabile soltanto attraverso PCR, risulterebbe quindi essere localizzata negli strati sopra basali dell'epidermide. In questo lavoro di tesi abbiamo quindi analizzato il ruolo svolto da Scotin durante il differenziamento epidermico. Tale gene è espresso nel reticolo endoplasmatico e nella membrana nucleare. È stato dimostrato, precedentemente a questo lavoro, come l'attività pro-apoptotica di Scotin ma anche quella di attivatore dello stress del reticolo endoplasmatico sia indotta da p53 e dall'isoforma TAp73 α . Con la finalità di analizzare se anche p63, altro membro della famiglia di p53, possa regolare l'espressione di tale gene abbiamo condotto esperimenti di RT-PCR quantitativa su linee cellulari inducibili esperimenti TA o $\Delta Np63$. I risultati hanno evidenziato come TAp63 induca l'espressione di Scotin nella linea cellulare Saos-2, mentre l'isoforma ΔN sembrerebbe inibire l'espressione di questo gene. Dopo avere confermato che Scotin è in grado di attivare GADD153, un fattore trascrizionale indotto in seguito all'induzione di "stress" del reticolo abbiamo osservato come l'espressione di GADD153 e dello stesso Scotin aumentino nella linea cellulare HaCat indotta a differenziare *in vitro*. Questi dati preliminari sono stati confermati poi da esperimenti condotti su cheratinociti murini indotti a differenziare *ex vivo*. Tali studi hanno infatti dimostrato come durante il differenziamento

epidermico vi sia una forte induzione di Scotin a livello proteico. Successivamente abbiamo analizzato in quale strato epidermico fosse localizzata l'espressione di questo gene. Immunofluorescenze condotte su sezioni di pelle di topi appena nati hanno evidenziato che Scotin risulta essere espresso negli strati sopra basali dell'epidermide, ma non in quello basale dove è ampiamente presente $\Delta Np63$. Questi dati suggeriscono come un incremento di TAp63 oppure un incremento del rapporto TAp63/ $\Delta Np63$ negli strati sopra basali possa attivare l'espressione di Scotin. Esperimenti condotti su linee epiteliali primarie umane (NHEK) indotte a differenziare hanno confermato poi l'induzione di Scotin sia a livello trascrizionale che a quello proteico. Tuttavia l'induzione di questo nuovo gene bersaglio di TAp63 risulta essere meno evidente di quella osservata nei cheratinociti murini. Questa differenza potrebbe essere probabilmente causata da una ridotta capacità/potenziale di differenziare nelle NHEK *in vitro* e ciò è confermato dalla più lenta diminuzione nell'espressione di $\Delta Np63$ durante il differenziamento epidermico. E' stato infatti precedentemente riportato come tale isoforma svolga un ruolo inibitore sull'espressione di Scotin. In conclusione questi dati dimostrano come durante il differenziamento epidermico vi sia induzione di "stress" del reticolo endoplasmatico attraverso l'induzione di Scotin e di GADD153. Nell'articolo di Bourdon et al., (2002) è stata dimostrata la capacità di Scotin di attivare *in vitro* la caspasi esecutrice 3. L'espressione di questa caspasi, effettrice della morte cellulare, è stata infatti rilevata in cheratinociti embrionali (giorno 15.5) indotti a differenziare. Dal momento che la caspasi 3 è attivata da Notch-1 durante il differenziamento di tali cheratinociti è possibile ipotizzare che lo stress del reticolo endoplasmatico, indotto attraverso Scotin, possa essere il segnale a monte che conduce all'attivazione di tale caspasi. E' ovviamente necessario ricordare che l'attivazione della caspasi 3 non induce un'apoptosi classica nella pelle in quanto il differenziamento epidermico risulta essere una forma di morte cellulare differente dall'apoptosi. Ciò non esclude però che alcuni dei protagonisti di quest'ultima via possano svolgere un ruolo nell'attivazione dei geni specifici per il processo di formazione dell'involucro corneo.

MATERIALI E METODI

5.1 Isolamento delle varianti di splicing

5.1.1 Clonaggio del cDNA murino della TGasi 3 mediante RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalla pelle di topi appena nati mediante l'utilizzo dell'RNeasy Kit (Qiagen). La reazione di retrotrascrizione è stata compiuta con la SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Il cDNA della transglutaminasi 3 murina è stato successivamente amplificato con la seguente coppia di primers: mTG3F1 (+) (5'-ACACCATCTCTGTCATTCCC-) e mTG3R1 (-) (5'-CTGGACAACATAGGCAACA). Il programma utilizzato nella reazione di PCR è il seguente: 95°C x 30s seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 58°C x 40s, 70°C x 1min e 40s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Il prodotto di amplificazione è stato corso su un gel allo 0,8% di agarosio e colorato successivamente con etidio bromuro. I frammenti del peso molecolare atteso sono stati purificati da gel utilizzando Qiaex II Extraction Kit (Qiagen, Crawley, UK). Circa 50 ng di inserto sono stati utilizzati per la reazione di ligazione utilizzando il vettore per il clonaggio TA pGem-T-Easy (Promega) e la trasformazione è stata effettuata utilizzando le cellule competenti TOP10 (Invitrogen). Il DNA estratto dalle colonie è stato poi sequenziato utilizzando un sequenziatore ABI-PRISM 377DNA. I campioni sono stati preparati per l'analisi di sequenza utilizzando il kit BigDyeTermination Reaction Kit.

5.1.2 Clonaggio del cDNA umano della TGasi 3 mediante PCR

L'RNA totale è stato inizialmente estratto da cheratinociti umani primari (NHEK). La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando la SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Il cDNA della transglutaminasi 3 umana è stato amplificato utilizzando la seguente coppia di primers: hTG3F2 (+) (5'-CTGAGAAGAGGCAGAGGAAGG-) ed hTG3R2 (-) (5'-TCATTCGGCTACATCGATGGAC). Il programma utilizzato nella reazione di PCR è il seguente: 95°C x 3min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 58°C x 45s, 70°C x 1min 50s seguiti da un singolo passaggio a 70°C x 5min. Il prodotto di PCR è stato purificato come già descritto precedentemente.

5.1.3 PCR quantitativa

La reazione di retrotrascrizione è stata realizzata utilizzando 800 ng di RNA totale (SuperScript-II con le stesse modalità precedentemente descritte). La macchina utilizzata (ABI-7500 SDS ; Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) richiede l'utilizzo del Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG with ROX (#11744-500) in un volume finale di 25 μ l. Una regione specifica della TGasi 3 umana è stata amplificata con la seguente coppia di primers: hTG3F-real (+) (5' -TATCAGCATCTCCAGTCCTGCC-) e hTG3R-real (-) (5' -GCCAATTCGGTTTGTGCTTCC-). Due μ l del cDNA sono stati aggiunti alla mix di reazione. L'analisi di ogni campione è stata condotta in triplicato. I campioni sono stati inoltre amplificati con la seguente coppia di primers per testare l'efficienza della transfezione: GFP-F (+) (5' -GCTGACCCTGAAGTTCATCTG-) e GFP-R (-) (5' -TCTTGTAGTTGCCGTCGTCC- strand). La reazione è stata condotta utilizzando il seguente programma di PCR: 95°C per 3 min seguiti da 40 cicli a 94°C per 20s e 59°C for 40s.

5.1.4 Linee cellulari e trasfezioni

La linea cellulare HEK-293 è stata cresciuta nel terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con l'aggiunta di siero fetale bovino al 10% (v/v). Le cellule sono state successivamente trasfettate utilizzando il kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nella modalità descritta dalla casa produttrice. Le cellule sono state piastrate il giorno prima della trasfezione in terreno DMEM in piastre da 100 mm alla concentrazione di 10^5 cellule per cm^2 . Per la trasfezione sono stati utilizzati separatamente 12 μ g di DNA dei seguenti vettori: pcDNA3.1 myc-tag, pcDNA3.1-TG3-myc e pcDNA 3.1- Δ 9 Δ 10TG3-myc. Aliquote degli enzimi estratti dalla trasfezione sono state utilizzate per saggi sull'attività transglutaminasica. La linea cellulare NHEK è stata cresciuta nel terreno Keratinocyte Basal Medium-2 (Cambrex) supplementato con KGM-2 Single Quots (Cambrex). I cheratinociti umani (NHEK) sono stati indotti a differenziare con l'aggiunta di 1.2 Mm Ca^{2+} nel terreno. Le piastre sono state collagenate con il collagene di tipo III da Calf Skin (Sigma). Le cellule sono state fatte crescere a 37°C in atmosfera umidificata e 5% CO_2 .

5.1.5 Western blots

Dopo la quantificazione delle proteine totali mediante Bradford (Biorad) 30 µg per ogni campione sono stati miscelati con tampone Laemmli 4X e successivamente bolliti a 100°C per 10 minuti. Le proteine sono state separate su un gel denaturante di acrilamide al 10% e trasferite successivamente su filtri PVDF. I filtri sono stati bloccati dopo il trasferimento in 10% latte in polvere per due ore. Le membrane sono state incubate, in agitazione, con i seguenti anticorpi: anti-Myc-TAG (Monoclonal antibody (9B11) #2276 Cell Signaling, Technologies) diluizione 1:1000, anti-β-Tubulina (H-235) (sc-9104 Santa Cruz Biotechnology; BD Living Colors™) diluizione 1:1000 ed anti-GFP BD Living Colors™ Monoclonal Antibody Cat.No. 632375 or 8362-1. Dopo tre lavaggi in PBS-Tween (0,1%) è stato aggiunto l'anticorpo secondario (1:10000) nella soluzione bloccante per un'ora. La rilevazione delle proteine è stata effettuata mediante il kit ECL (metodo chemiluminescente) (Amersham).

5.1.6 Misura dell'attività transglutaminasica

L'attività transglutaminasica è stata effettuata misurando l'incorporazione della [3H]putrescina nella N,N'-dimetilcaseina, modificando un protocollo descritto precedentemente (Melino et al., 2000). La miscela di reazione tipicamente conteneva 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2.5 mg/ml caseina (Sigma), 10 mM CaCl₂, 5 mM DTT, 250 µM putrescina "fredda" (Sigma) e 0.5 µM [3H]putrescina (1.4 µCi, attività specifica 28 Ci/mmol, Amersham). La TGasi 5 attiva è stata aggiunta nella miscela di reazione in un volume di 100 µl e incubata a 37°C. La reazione è stata bloccata ad intervalli di 10 minuti, trasferendo 35 µl della miscela di reazione in filtri di carta 3MM (Whatmann). In queste condizioni, la [3H]putrescina, incorporata nella caseina in seguito all'azione delle transglutaminasi, precipita sul filtro. La [3H]putrescina non incorporata è stata eliminata mediante successivi lavaggi di 10 minuti con abbondanti volumi di acido tricloroacetico (TCA) al 15%, 10% e 5% e con etanolo assoluto. I filtri sono stati quindi asciugati all'aria ed incubati per 18h a temperatura ambiente con 4 ml di liquido di scintillazione, adatto a solubilizzare le membrane. La radioattività contenuta nei singoli campioni è stata misurata tramite β-counter.

5.2 Vettori per la ricombinazione omologa e PCR

5.2.1 PCR sui differenti organi e tessuti murini

Gli organi e tessuti sono stati prelevati da topi selvatici adulti ed è stato successivamente estratto l'RNA totale (RNeasy Kit -Qiagen). Le amplificazioni per le quattro transglutaminasi sono state condotte con le seguenti coppie di primers: mTG2F1 (+) (5' – TTCGTGTTTGCCGAGGTCAACG) ed mTG2R1 (-) (5' – CTTTCTCTGCCAGTTTGTTCAGGTG); mTG1F (+) (5' – ACCACCACAGTGCTCCGATG) ed mTG1R (-) (5' – CCACACGTGGAAGTTCCAAAC); mTG5F1 (+) (5' – CCAACTCTTGCTCCCTTGGTAGATG) ed mTG5R1 (-) (5' – GCAGCCACTCCAGGATCAGTTTC); mTG3F1 (+) (5' – CTCAAACCTAACGCATCTTTCGGC) ed mTG3R1 (+) (5' – GGCTTCCGCACATGAGCCTGTTC). Il programma di PCR utilizzato per tutte e quattro le amplificazioni è il seguente: 95°C x 3min seguito da 33 cicli di 94°C x 35s, 57°C x 35s, 72°C x 35s seguiti da un singolo passaggio a 72°C per 5min.

5.2.2 Clonaggi per la realizzazione del vettore mTG3-cKO

La regione per la ricombinazione omologa è stata amplificata da DNA genomico estratto da cellule murine 129SvJ. Per le amplificazioni sono stati utilizzate le seguenti coppie di primers: mTG3contif2 (+) (5' – TCTGTCAAACAGCGGATGAT) ed mTG3contifR2 (-) (5' – CTCGGCTGCAAAGTGATTCTA); BspI-3'F1,2 (+) (5' – TCCCTGGGCATAGCGTA) ed BspI-R2 (-) (5' – CCACAACAAAACCAAACCGT); BspI-LOX3-F(+) (5' – ATGTTGCTGAGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTA TTAACCATGTAACCTGCAGGACCTAC) ed NotI-R (-) (5' – GTTTGCGGGCCGCTAGGGAGAAAGC). Il programma di PCR utilizzato per l'amplificazione con la coppia di primers mTG3contif2/R2 è il seguente: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 58°C x 50s, 70°C x 4min seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Il prodotto di amplificazione è stato corso su un gel allo 0,8% di agarosio e colorato

successivamente con etidio bromuro. Per l'amplificazione con la coppia di primers BlnI-F1,2/R2 è stato utilizzato il seguente programma: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 57,5°C x 50s, 70°C x 1min e 20s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Su questo amplificato è stata fatta successivamente una PCR "nested" con la coppia di primers BlnI-LOX3-F/NotI-R utilizzando il seguente programma: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 45s, 59,8°C x 50s, 70°C x 1min e 10s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. La cassetta contenente la neomicina è stata amplificata con la seguente coppia di primers dal vettore PMC-Neo+MCS+KpnLox+NheLox : mTG3-Neo-HINDIII-F (+) (5'-CGATGATATCAAGCTTGGTACTATAA-) ed mTG3-Neo-HINDIII-R (-) (5' - TATAAGCTTGTGCGACGGATCCC). Il programma utilizzato è il seguente: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 60°C x 45s, 70°C x 1min seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Il prodotto di PCR è stato successivamente purificato e digerito con l'enzima HindIII per il clonaggio nel vettore di destinazione finale. La cassetta della Timidin chinasi è stata excisa mediante digestione con l'enzima di restrizione XhoI dal vettore pTK e clonata successivamente nel vettore mTG3-cKO.

5.2.3 Clonaggio in pFRLT1

Il frammento di DNA genomico da clonare NotI/Sall in pFRLT1 è stato amplificato dal gene TGM3 utilizzando la seguente coppia di primers: mTG3F2bis (+) (5' - CCTCTCTGTCAAACAGCGGATGATGTCT) ed mTG3-Sall (-) (5' - GATGTCGACTCGGGAGGCCTGAGTTC). Il programma di PCR utilizzato per l'amplificazione è il seguente: 95°C x 4min seguito da 28 cicli di 94°C x 50s, 60°C x 45s, 70°C x 2min e 40s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Il frammento da clonare BamHI in pFRLT1 è stato amplificato utilizzando la seguente coppia di primers mTG3KO(ex6-7)F-Bam (+) (5' - TTCGGATCCAGTACTGTCAGTAG) ed mTG3KO (ex6-7) BAMHI REV (-) (5' -CGTGGATCCGAGGTTTCAGGGTAA). L'amplificazione è stata condotta con le seguenti condizioni: 95°C x 4min seguito da 28 cicli di 94°C x 50s, 60°C x 45s, 72°C x 1min e 10s seguiti da un singolo passaggio a 72°C per 10min. Il frammento da clonare BstBI in pFRLT1 è stato amplificato con la seguente coppia di primers mTG3KOSfuIFWD (+) (5' - GGAATTTCGAAGGAAAGTAACACGTG) ed mTG3Ko3'RSfuI-3 (-) (5' - AAAACATTCGAACAATATGGCTATA). L'amplificazione è stata

condotta con le seguenti condizioni: 95°C x 3min seguito da 25 cicli di 98°C x 15s, 54,5°C x 25s, 72°C x 2min seguiti da un singolo passaggio a 72°C per 5min.

5.3 Clonaggio del positivo di PCR per il vettore mTG3-cKO

L'annealing degli oligo mTG3-BamHI-F (+) (5' – GATCCAAAAGTCTACAATGTGGCAGCACCCCTTCTATCTGAAGGAG CAAATATCTCG) ed mTG3-BamHI-R (-) (5' – GATCCGAGATATTTGCTCCTTCAGATAGAAGGGTGCTGCCACATT GTAGACTTTTG) è stato compiuto nel seguente modo: 1) 94°C x 5min, 2) 80°C x 10min, 3) diminuisce di 0,5°C ogni ciclo, 4) Ripeti ciclo 2, 90 volte. Gli oligo sono stati clonati BamHI nel vettore mTG3-cKO contenente soltanto il DNA genomico del gene TGM 3 dall'esone 4 al 7 con le relative regioni introniche e successivamente è stata inserita, come descritto sopra, la cassetta della neomicina.

5.4 PCR per l'analisi dei cloni di cellule ES dopo l'elettropotazione

L'amplificazione primaria sul DNA genomico estratto dai cloni di cellule staminali embrionali (ES) (Wizard SV96 Genomic Promega) è stato amplificato con la seguente coppia di primers : mTG3Screen2F1 (+) (5' – GTGGCAGCACCCCTTCTATCTGA) ed RevNeoTG3-1 (-) (5' – CGAATTCGCCAATGACAA). L'amplificazione è stata condotta con le seguenti condizioni: 95°C x 4min seguito da 39 cicli di 94°C x 45s, 55°C x 40s, 70°C x 2min e 45s seguiti da un singolo passaggio a 72°C per 10min. Sull'amplificato primario è stata poi condotta una PCR "nested" con la seguente coppia di primers: mTG3Screen2F2 (+) (5'- GACTCTTGGGTCAGCTTAGCTT) ed mTG3Neo3(screen) (-) (5' – GCAAACCCACACTGCTCGACATTG). Il programma di PCR utilizzato è il seguente: 95°C x 4min seguito da 39 cicli di 94°C x 45s, 59°C x 40s, 70°C x 2min e 40s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min.

5.5 PCR per lo screening della ricombinazione al 3'

L'amplificazione primaria sul DNA genomico estratto dai cloni di cellule ES è stato amplificato con la seguente coppia di primers: mTG3Screen3'F1 (+) (5' –GCTATCAGGACATAGCGTTGG) ed mTG3Screen3'R1 (-) (5' –TCAGAATTGACTGTGGGGAG). Il programma di PCR utilizzato per l'amplificazione è il seguente: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 55°C x 40s, 70°C x 2min e 50s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Il prodotto è stato successivamente amplificato con la seguente coppia di primers: mTG3Screen3'F2 (+) (5' –ATCGCCTTCTATCGCCTTC) ed mTG3Screen3'R2 (-) (5' –GACACCACAACAAAACCAAAC). Il programma utilizzato è il seguente: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 54,5°C x 40s, 70°C x 2min e 40s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min.

5.6 Southern blot

Per l'analisi mediante Southern blot 10µg di DNA genomico sono stati digeriti con 100U dell'enima EcoRI tutta la notte. La digestione è stata caricata successivamente su un gel allo 0.8% senza etidio bromuro e corsa in TBE 1X a 40V per tutta la notte. Il trasferimento alcalino (0.4 NaOH) del DNA sulla membrana Hybond N⁺ (Amersham) è stato effettuato col vuoto. Successivamente il DNA è stato fissato agli UV (Bio-Link) e preibridato per un'ora e trenta minuti a 65°C in: 5x SSC, SDS 0.5% e Denhardt's 5X. Alla mix è stata aggiunto sperma di salmone alla concentrazione di 100 µg/mL. La marcatura è stata realizzata mediante random priming (Primers a Gene Labeling System kit Promega) con 50 µCi di ([α-³²P]dCTP) (GEHealthcare). L'ibridazione è proceduta per tutta la notte a 65°C nella mix descritta precedentemente ma privata dello sperma di salmone. I lavaggi sono stati compiuti con il seguente ordine :25min in 2x SSC-0.1% SDS; 15min in 1x SSC-0.1% SDS ed infine 15min in 0.5x SSC-SDS 0,1%.

5.6.1 Sonde utilizzate per l'esperimento di Southern blot

La sonda gene specifica (esone 6/7) è stata ottenuta attraverso l'amplificazione del DNA genomico del gene *TGM3* con la seguente coppia di primers: mTG3-ex6-7F (+) (5' –TCAGACTTGGCCCATTAAC) ed

mTG3-ex6-7R (-) (5' -CAGAGGTTTCAGGGTAAACAGG). Il programma di PCR utilizzato per l'amplificazione è il seguente: 95°C x 4min seguito da 40 cicli di 94°C x 50s, 55°C x 40s, 72°C x 40s seguiti da un singolo passaggio a 70°C per 10min. Il frammento è stato corso poi su gel d'agarosio 0.8% e purificato. La sonda neomicina specifica (Neo probe) è stata ottenuta attraverso la digestione con l'enzima XhoI del vettore PMC-Neo+MCS+KpnLox+NheLox.

5.7 Immunofluorescenze, colture cellulari e PCR nello studio di Scotin e p63

5.7.1 RT-qPCR

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule (NHEK ed HaCat) mediante l'utilizzo dell'RNeasy Kit (Qiagen). La reazione di retrotrascrizione è stata compiuta con la SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Lo strumento utilizzato è un ABI-7500 SDS (Applied Biosystem) La mix di reazione utilizzata è Platinum SYBR Green qPCR SuperMix without ROX (Invitrogen) in un volume finale di 25 µl Il cDNA totale è stato successivamente amplificato con la seguente coppia di primers: hScotF1 (+) (5'-TTG GAG GCT GAG GAT AAG GGG-) hScotR1 (-) (5'-TGT GGA GCG AGG AAA GGT GTG-) hGADD153F (+) (5'-GCT TCT CTG GCT TGG CTG ACT-) hGADD153R (-) (5'-CCA GGG AGC TCT GAC TGG AA-), hActinF (+) (5'- AAA GAC CTG TAC GCC AAC A-) h ActinR (-) (5'-CGG AGT ACT TGC GCT CAG-) hTap63F (+) (5'- GGA CTG TAT CCG CAT GCA G) hTap63R (+) (GAG CTG GGC TGT GCG TAG), hDNp63F (GAA GAA AGG ACA GCA GCA TTG AT), hDNp63R (-) (GGG ACT GGT GGA CGA GGA G). La reazione è stata La reazione stata condotta utilizzando il seguente programma di PCR: 95°C per 3 min seguiti da 40 cicli a 94°C per 20s e 59°C for 40s.

5.8 Cheratinociti primari, colture cellulari

I cheratinociti primari sono stati isolati dalla pelle di topi appena nati (ceppo CD-1) come già descritto da (*Yuspa et al., 1989*). La pelle è stata immersa in

una soluzione contenente tripsina/EDTA per tutta la notte a 4°C e successivamente sono stati isolati i cheratinociti murini. Per queste colture cellulari si utilizzano piastre collagenate ed un terreno contenente 0.05mM Ca^{2+} , mentre per il differenziamento la concentrazione di calcio finale utilizzata è pari ad 1.2 mM Ca^{2+} . Le linee inducibili TAp63 α e $\Delta\text{Np63}\alpha$ (Saos-2) sono state fatte crescere come già descritto da (Gressner *et al.*, 2005). La linea cellulare HaCat è stata invece coltivata in terreno DMEM con l'aggiunta del siero fetale bovino al 10% (FBS). Gli embrioni sono stati invece fissati in 4% paraformaldeide, mentre la bollitura per lo smascheramento dell'antigene è stata condotta in sodio citrato 0.01 M (pH 6) per tre cicli da 5 minuti e le sezioni sono state lasciate raffreddare fino a circa 50°C. Queste ultime sono state poi incubate per 2 ore con l'anticorpo primario ed un'ora con quello secondario per la successiva analisi al confocale (Nikon, Tokyo Japan, C1).

5.9 Microscopia confocale

Le colture cellulari (HaCat and Saos-2) sono state piastrate alla densità di 30000 cellule/cm² o 25000 cellule/cm² su vetrini copri-oggetto da 20 mm. Le colture cellulari (Saos ed HaCat) sono state fissate come descritto nell'articolo di (Gressner *et al.*, 2005). Le cellule sono state incubate successivamente per 1h a temperatura ambiente RT utilizzando i seguenti anticorpi: anti-GADD153 (Clone B3, Santa Cruz; diluizione 1/100) ed anti-loricrina policlonale (Covance; diluizione 1/200). La fluorescenza è stata valutata mediante microscopia confocale (Nikon, C1 on Eclipse TE200; EZC1 software).

Gli embrioni sono stati invece fissati come già descritto nell'articolo (Candi *et al.*, 2006). Successivamente sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-p63 monoclonale (Ab4, Neomarkers, Fremont, California, USA; diluizione 1/300) ed anti-mouse Scotin policlonale (JC105; diluizione 1/150).

5.9.1 Trasfezioni e Western blot

La linea cellulare Saos-2 è stata cresciuta in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con l'aggiunta di siero FBS al 10%. Le cellule sono state trasfettate utilizzando la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ed i Western blot sono stati realizzati come già descritto da Candi *et al.*, 2006. Gli anticorpi

MATERIALI E METODI

utilizzati sono i seguenti: anti-p63 monoclonale Ab4 (Neomarkers, Fremont, California, USA; diluizione 1/500), anti-tubulina policlonale (H-235, Santa Cruz, diluizione 1:1000), anti-K10 policlonale (Covance; diluizione 1/500), anti-mouse Scotin policlonale (JC105; diluizione 1:1000), anti-human Scotin policlonale (H105; diluizione 1/1000) ed anti-involucrina policlonale (Covance; diluizione 1:1000). Le proteine sono state rilevate mediante ECL.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Hafez K., Safer A.M., Selim M.M., Rehak A. Familial continual skin peeling. *Dermatologica*, 1983. **166**: 23-31.
- Achyuthan K.E., Greenberg C.S., Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem*, 1987. **262**: 1901-1906.
- Adler H.T., Chinery R., Wu D.Y., Kussik S.J., Payne J.M., Fornace A.J. jr, Tkachuk D.C. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**: 7050-7060.
- Aeschlimann D., Paulsson M., Transglutaminases: protein crosslinking enzymes in tissue and body fluids. *Thromb Haemostasis*, 1994.**71**:402-415
- Aeschlimann D., Koeller M.K., Allen-Hoffmann B.L., Mosher D.F., Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminases gene family from human keratinocytes. *J Biol Chem*, 1998.**273**: 3452-3460.
- Ahvazi B., Kim H.C., Kee S.H., Nemes Z., Steinert P.M., Threedimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J*, 2002.**21**: 2055- 2067.
- Ahvazi B., Steinert P.M., A model for the reaction mechanism of the transglutaminase 3 enzyme. *Exp Mol Med*, 2003.**35**: 228-242.
- Ahvazi B., Boeshans K.M., Idler W., Baxa U., Steinert P.M. Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *J Biol Chem*, 2003. **278**: 23834-41.
- Ahvazi B., Boeshans K.M., Idler W., Baxa U., Steinert P.M., Rastinejad F. Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *J Biol Chem*, 2004a. **279**: 7180-92
- Albers K., Fuchs E., The expression of mutant epidermal keratin c- DNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J Cell Biol*, 1987 **105**: 791-806.
- Albers K., Fuchs E., The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int Rev Ciytol*, 1992 **134**: 243-279.
- Alkemade J.A., Molhuizen H.O., Ponec M., Kempenaar J.A., Zeeuwen P.L., de Jongh G.J., SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci*, 1994.**107**: 2335-2342.
- Askew, G.R. Doetschman, T. and Lingrel, J.B. Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol.Cell Biol*, 1993. **13**: 4115-4124
- Attar P.S., Wertz P.W., Ncarthur M., Imakado S., Bickenback J.R. & Roop D.R. (1997) Inhibition of retinoid signalling in transgenic mice alters lipid

BIBLIOGRAFIA

- processing and disrupts epidermal barrier function. *Mol. Endocrinol.* **11**, 792-800.
- Augustin M., Bambreger C., Paul D. & Schmale H. (1998) Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mamm. Genome*, **9**, 899-902.
- Bakkers J., Hild M., Kramer C., Furutani-Seiki M. & Hammerschmidt M., (2002) Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signalling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell*, **2**, 617-627.
- Bamberger C., Pollet D. & Schmale H. (2002) Retinoic acid inhibits down-regulation of DeltaNp63alpha expression during terminal differentiation of human primary keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 133-138.
- Bassik M.C., Scorrano L, Oakes S.A., Pozzan T., Korsmeyer S.J. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J.*, 2004. **23**: 1207-1216.
- Bedell M.A., Largaespada D.A., Jenkins N.A., Copeland N.G. Mouse models of human disease. Part II: recent progress and future directions. *Genes Dev*, 1997. **11**:11-43.
- Bernassola F., Federici M., Corazzari M., Terrinoni A., Hribal M.L., De Laurenzi V., Ranalli M., Massa O., Sesti G., McLean W.H.I., Citro G., Barbetti F., Melino G., Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB J*, 2002.**16**: 1371-1378.
- Blattner C., Sparks A., Lane D.P. Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**: 3704-3713.
- Board P.G., Weeb G.C., McKee J., Ichinose A., Localization of the coagulation factor XIIIa subunit gene to chromosome band 6p24-25. *Cytogenet Cell Genet*, 1988.**48**: 25-27.
- Boatright K.M., et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol.Cell*, 2003. **11**: 529-541
- Boelens J., Lust S., Offner F., Bracke M.E., Vanhoecke B.W. The endoplasmic reticulum:a target for new anticancer drugs. *In Vivo*, 2007. **21**:215-226
- Bouhassira E.E., et al., An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (protein 4.2 NIPPON). *Blood*, 1992. **79**: 1846-1854.

BIBLIOGRAFIA

- Bourdon J.C., Renzing J., Robertson P.L., Fernandes K.N., Lane D.P. *Scotin*, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. *J Cell Biol*, 2002. **158**: 235-245.
- Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L., Gooris G.S. & Ponc M. (2003) Structure of the skin barrier and modulation by vesicular formulation. *Prog. Lip. Res.*, **42**, 1-36.
- Boyce M., Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Diff*, 2006. **13**: 363-373.
- Brody L., The modified plasma membrane of the transition and horny cells in normal human epidermis as revealed by electron microscopy. *Acta Derm Venereol*, 1969. **49**: 128-138.
- Brush M.H., Weiser D.C., Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**: 1292-1303.
- Burgoyne R.D., Weiss J.L., The neuronal Ca²⁺ sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J*, 2001. **353**: 1-12.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*, 2003. Vol. **7** No.3: 249-257.
- Cadot B., Rufini A., Pietroni V., Ramadan S., Guerrieri P., Melino G., Candi E. Overexpressed transglutaminase 5 triggers cell death. *Amino Acid*, 2004. **26**(4): 405-8.
- Camus L., Gley E., *C R Soc Biol (Paris)*, 1896. **48**: 787..
- Candi E., Melino G., Lahm A., Ceci R., Rossi A., Kim I.G., Ciani B., Steinert P.M., Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 13693-13702.
- Candi E., Tarcsa E., Kartasova T., Idler W.W., Marekov L.N., Steinert P.M., Biochemical and transglutaminase substrate properties of the small proline rich 1 family of cornified cell envelope proteins: integration with loricrin. *J Biol Chem*, 1999. **274**: 7226-7237.
- Candi E., Oddi S., Terrinoni A., Paradisi A., Ranalli M., Finazzi-Agrò A., Melino G., Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin and small proline-rich proteins *in vitro*. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 35014-35023.
- Candi E., Oddi S., Paradisi A., Terrinoni A., Ranalli M., Teofoli P., Citro G., Scarpato S., Puddu P., Melino G., Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J Invest Dermatol*, 2002. **119**: 670-677.

BIBLIOGRAFIA

- Candi E., Paradisi A., Terrinoni A., Pietrosi V., Oddi S. Cadot B., Jogini V., Meiyappan M., Clardy J., Finazzi-Agrò A., Melino G. Transglutaminase 5 is regulated by guanine/adenine nucleotides. *Biochem J*, 2004. **381**: 313-9.
- Carafoli E., Molinari M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **247**: 193-203
- Candi E., Rufini A., Terrinoni A., Dinsdale D., Ranalli M., Paradisi A., De Laurenzi V., Spagnoli L. G., Catani M. V., Ramadan S., Knight R. A., Melino G. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Diff*, 2006. **13**:1037-47.
- Cariello L., Wilson J., Lorand L., Activation of transglutaminase during embryonic development. *Biochemistry*, 1984. **23**: 6843-6850.
- Cassidy A., van Steensel M.A., Steijlen P.M., van Geel M., van der Velden J., Morley S.M., Terrinoni A., Melino G., Candi E., McLean W.H. A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet*, 2005. **77**: 907-17.
- Chakravarty R., Rice R.H., Acylation of keratinocyte transglutaminase by palmitic and myristic acids in the membrane anchorage region. *J Biol Chem*, 1989. **264**: 625-629.
- Chambers C.A. TKO'ed: lox, stock and barrel. *Bioessays*, 1994. **16**: 865-868.
- Chang S.K., Chung S.I. Cellular transglutaminase. The particulate-associated transglutaminase from hondrosarcoma and liver: partial purification and characterization. *J Biol Chem*, 1986. **261**(18): 8112-21
- Chavanas S., Bodemer C., Rochat A., Hamel-Teillac D., Ali M., Irvine A. D., Bonafe J.L., Wilkinson J., Taieb A., Barrandon Y., Harper J.I., de Prost Y., Hovnaian A. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, causes netherton syndrome. *Nat Genet*, 2000, **25**: 141-142.
- Chen B.S., Wang M.R., Xu X., Cai Y., Xu Z.X., Han Y.L., Wu M., Transglutaminase-3, an esophageal cancer-related gene. *Int J Cancer*, 2000. **88**: 862-865.
- Cheng T., Hitomi K., van Vlijmen-Willems I.M., de Jongh G.J., Yamamoto K., Nishi K., Watts C., Reinheckel T., Schalkwijk J., Zeeuwen. Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and the Short Chain Form of Cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem*, 2006. **281**:15893-9.

BIBLIOGRAFIA

- Chung S.I., Comparative studies on tissue transglutaminase and factor XIII. *Ann N Y Acad Sci*, 1972. **69**: 303-307.
- Choen-Tannoudjii M., Robine S., Choulika A. (-Sce-) induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cell. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**: 1444-1448.
- Citron B.A., SantaCruz K.S., Davies P., Festoff B.W., Intron-exon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 3295-3301.
- Clarke D.D., Mycek M.J., Neidle A., Waelsch H., The incorporation of amines into proteins. *Arch Biochem Biophys*, 1957. **79**: 338-354.
- Colucci-Guyon, E., Portier, M.-M., Dunia, I. et al., Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*, 1994. **79**: 679-694
- Cooke. J., Nowak, M. A., Boerlijst, M. and Maynard-Smith, J. Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet.*, 1997. **13**: 360-364.
- Dadabay C.Y., Pike L.J., Rapid increases in the transglutaminases activity of A431 cells following treatment with epidermal growth factor. *Biochemistry*, 1987. **26**: 6587-6591.
- Darling S.M., Abott C.M. Mouse models of human single gene disorders I: Nontransgenic mouse. *Bioessay*, 1992. **14**: 359-366.
- De Laurenzi V., Melino G., Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol Cell Biol*, 2001. **148**: 148-155.
- Dickinson D.P., Cysteine peptidases of mammals: Their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Cri.Rev Oral Biol Med*, 2002. **13**: 238-275
- Di Venere A., Rossi A., De Matteis F., Rosato N., Finazzi-Agrò A., Mei G., Opposite effects of Ca²⁺ and GTP binding on tissue transglutaminase tertiary structure. *J Biol Chem*, 2000. **275**: 3915-3921.
- Djian, P., Easley K. & Green H. (2000) Targeted ablation of the murine involucrin gene. *J. Cell Biol*, 2000. **151**: 381-388.
- Dlugosz A.A., Yuspa S.H., Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**: 409-414.
- Doetschman T., Gregg R., Maeda N. Targetted correction of a mutant hrpt gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 1987. **330**: 576-578.

BIBLIOGRAFIA

- Dorin J.R., Duckinson P., Alton E.W., Smith S.N., Geddes D.M., Stevenson B.J. Cystic fibrosis in the mouse by targeted isertional mutagenesis. *Nature*, 1992. **359**: 211-215.
- Drenth J., Jansonius J.N., Koekoek R., Swen H.M., Wolthers B.G., Structure of papain. *Nature*, 1968. **218**: 929-932.
- Dubbink H.J., Verkaik N.S., Faber P.W., Trapman J., Schroder F.H., Romijn J.C., Tissue specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase. *Biochem J*, 1996. **315**: 901-908.
- Eckert R.L., Green H., Structure and evolution of the human involucrin gene, *Cell*, 1986. **46**: 583-589.
- Eckert R.L., Crish J.F., Robinson N.A., The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev*, 1997. **77**: 397-424.
- Eckert R.L., Sturniolo M.T., Broome A.M., Ruse M., Rorke E.A. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*, 2005. **124**: 481-492.
- Egberts F., Heinrich M., Jensen J.M., Winoto-Morbach S., Pfeiffer S., Wickel M., Schunck M., Steude J., Saftig P., Proksch E., Schutze S. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J Cell Sci*, 2004. **117**: 2295-2307.
- El-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W. & Vogelstein B. Definition of a consensus binding sites for p53. *Nat Genet*, 1992. **1**, 45-49.
- Elias P.M. & Friend D.S. (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 1975. **65**, 180-191.
- Erickson R.P. Mouse mdels of human genetic disease: which mouse is more like a man? *Bioesaays*, 1996. **18**: 993-998.
- Esposito C., Pucci P., Amoresano A., Marino G., Cozzolino A., Porta R., Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. Posttranslational modifications and activation by phosphatidic acids. *J Biol Chem*, 1996. **271**: 27416-27423.
- Farbman A.I., Plasma membrane changes during keratinization. *Anat Rec*, 1966. **156**: 269-282.
- Festing M.F.W. Inbreed strains of mice. *Mouse Genome*, 1994. **92**:373-495.
- Flores E.R., Tsai K.Y., 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*, **416**, 560-564.
- Floyd E.E., Jetten A.M., Regulation of type I (epidermal) transglutaminase mRNA levels during squamous differentiation: down regulation by retinoid. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**: 4846-4851.

BIBLIOGRAFIA

- Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D., Ladermann U., Bastholm L., Boes M., Elling F., Leist M., Jattela M. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumour cell apoptosis induced by tumour necrosis factor. *J. Cell. Biol.*, 2001. **153**: 999-1010.
- Folk J.E. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. VI. Order of substrate addition. *J Biol Chem*, 1969.**244**: 3707-3713.
- Folk J.E., Finlayson J.S., The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem*, 1977. **31**: 1-133.
- Forslind B.A. (1994) A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Ven. Venereol.*, **74**, 1-6.
- Franke W.W., Schmid E., Mittnacht S., Grund C., Jorcano J.L., Integration of different keratins into the same filament system after microinjection of mRNA for epidermal keratins into kidney epithelial cells. *Cell*, **36**:813-825
- Franke W.W., Schmid E., Winter S., Osborn M., Weber K., Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res*, 1979.**123**: 25-46.
- Freinkel R.K. & Traczyk T.N. (1985) Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 295-298.
- Fuchs E., Epidermal differentiation. *Curr Opinion Cell Biol*, 1990.**2**: 1028-1035.
- Fuchs E., Weber K., Intermediate filaments: Structure, Dynamics, Function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 1994.**63**: 345-382.
- Furrer J., Enthart A., Kuhlewein A., Dehner A., Klein C., Hansen S., Schwaiger M., Kessler H. & Gemmecker G. (2003) Backbone 1H, 13C and 15N resonance assignments for the 25.8 kDa DNA binding domain of the human p63 protein. *J. Biomol. NMR*, **26**, 377-378
- Gan S.Q., Idler W.W., McBride O.W., Markova N., Steinert P.M., The structure organization and polymorphism of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*, 1990.**29**: 9432-9440.
- Gaut J.R. & Hendershot L.M. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**: 589-595
- Gentile V., Grant F.J., Porta R., Baldini A., Localization of the human prostate transglutaminase (type IV) gene (TGM4) to chromosome 3p21.33-p22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 1995. **27**: 219-220.
- Gerlai R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci*, 1996. **19**: 177-181.
- Goldman A.E., Steinert P.M., Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments. *Plenum Press*, 1990. New York, N.Y.

BIBLIOGRAFIA

- Goldsmith L.A., Martin C.M., Human epidermal transamidase. *J Invest Dermatol*, 1975. **64**: 316-321.
- Goldstein A.M. & Abramovitz W. (2003) Ceramides and the stratum corneum: structure, function and new methods to promote repair. *Int. J. Dermatol.*, **42**, 256-259.
- Gondo, Y., Nakamura, K., Nakao, K. et al. Gene replacement of the p53 gene with the LacZ gene in mouse embryonic stem cells and mice by using two steps of homologous recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994. **202**: 830-837
- Grant F.J., Taylor D.A., Sheppard P.O., Mathewes S.L., Lint W., Vanaja E., Bishop P.B., O'Hara P.J., Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from human prostate cDNA library. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **203**: 1117-1123.
- Grayson S., Johnson-Winegar A.G., Wintroub B.U., Isseroff R.R., Epstein E.H. Jr & Elias P.M. (1985) Lamellar body-enriched fraction from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 289-294.
- Green K.J., Jones J.C., Desmosomes and haemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J*, 1996.**10**: 871-881.
- Grenard P., Bates M.K., Aeschlimann D., Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 33066-33078.
- Green D.R. Overview:apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological Reviews*, 2003. **193**:5-9
- Grob T.J., Novak U., Maisse C., Barcaroli D., Luthi A.U., Pirnia F., Hugli B., Graber H., De Laurenzi V., Fey M.F., Melino G., Tobler A. Human $\Delta Np73$ regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Diff*, 2001. **12**: 1213-1223
- Gressner O., Schilling T., Lorenz K., Schleithoff Schulze E., Koch A., Schulze-Bergkamen H., Lena A.M., Candi E., Terrinoni A., Catani M.V., Oren M., Melino G., Krammer P.H., Stremmel W., Muller M. TAp63 α induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.*, 2005. **24**: 2458-2471.
- Hashimoto K., Cellular envelope of keratinized cells of human epidermis. *Arch Klin Exp Derm*, 1969. **235**: 374-385.
- Hashimoto K., Hamzavi I., Tanaka K., Shwayder T. Acral peeling skin syndrome. *J Am Acad Dermatol*, 2000. **43**: 1112-1119.

BIBLIOGRAFIA

- Hasty, P., Ramirez, S.R., Krumlauf, R. and Bradley, A. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature*, 1991. **350**: 243-246
- Hazell M., Marks R., Clinical, histologic and cell kinetic discriminants between lamellar ichthyosis and non-bullous congenital lamellar ichthyosisform erythroderma. *Arch Dermatol*, 1985. **121**: 489-493.
- Hettasch J.M., Peoples K.A., Greenberg C.S., Analysis of factor XIII substrate specificity using recombinant human factor XIII and tissue transglutaminase chimeras. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 25149-25156.
- Hitomi K., Kanehiro S., Ikura K., Maki M., Characterization of recombinant mouse epidermal-type transglutaminase (TGase 3): regulation of its activity by proteolysis and guanine nucleotides. *J Biochem (Tokyo)*, 1999. **125**: 1048-1054.
- Hitomi K., Ikura K., Maki M., GTP, an inhibitor of transglutaminases, is hydrolyzed by tissue-type transglutaminase (TGase 2) but not by epidermal-type transglutaminase (TGase 3). *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000. **64**: 657-659.
- Hitomi K., Horio Y., Ikura K., Maki K., Analysis of epidermal-type transglutaminase expression in mouse tissue and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**: 491-498.
- Hitomi K., Presland R.B., Nakayama T., Fleckman P., Dale B.A., Maki M., Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J Dermatol Sci*, 2003. **32**: 95-103.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. *Cold Spring harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 1994.
- Hohl D., The cornified cell envelope. *Dermatologica*, 1990. **80**: 201-211.
- Hohl D., Meherel T., Lichti U., Turner M.L., Roop D.R., Steinert P.M., Characterization of human loricrin. *J Biol Chem*, 1991. **266**: 6626-6636.
- Hohl D., Huber M., Frenk E., Analysis of the Cornified Cell Envelope in Lamellar Ichthyosis. *Arch Dermatol*, 1993. **129**: 618-624.
- Holleran W.V., Uchida Y., Halkier-Sorensen L., Harakate A., Hara M., Epstein J.H., Elias P.M. (1994) Consequences of β -glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alteration in Gaucher disease. *J. Clin. Invest.*, **93**, 1756-1764
- Horan, G.S., Ramirez, S.R., Featherstone, M.S. et al. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete

BIBLIOGRAFIA

- homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.*, 1995. **9**: 1667-1677.
- Horie K., Maeda S., Nishiguchi S. A replacement vector used to introduce subtle mutations into mouse genes. *Gene*, 1995. **166**: 197-204.
- Huber M., Rettler I., Bernasconi K., Frenk E., Lavrijsen S.P.M., Ponc M., Bon A., Lautenschlager S., Schorderet F.D., Hohl D., Mutations of Keratinocyte Transglutaminases in Lamellar Ichthyosis. *Science*, 1995a. **267**:525-528.
- Huber M., Rettler I., Bernasconi K., Wyss M., Hohl D., Lamellar Ichthyosis Is Genetically Heterogeneous - Cases with Normal Keratinocyte Transglutaminase. *J Invest Dermatol*, 1995b. **105**: 653-654.
- Ichinose A., Davie E.W., Characterization of the gene for a subunit of human factor XIII, a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988. **85**: 5829-5833.
- Ichikawa T., Suenaga Y., Koda T., Ozaki T., Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene*, 2007. 1-12
- Ishida-Yamamoto A., Iizuka H., Differences in involucrin immunolabeling within cornified cell envelopes in normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 1995. **104**: 391-395.
- Iismaa S.E., Wu M.J., Nanda N., Church W.B., Graham R.M., GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. *J Biol Chem*, 2000. **275**: 18259-18265.
- Jarnik M., Simon M.N., Steven A.C., Cornified cell envelope assembly: model based on electrotonic microscopic determinations of thickness and projected density. *J Cell Sci*, 1998. **111**: 1051-1060.
- Jensen J.M., Schutze S., Forl M., Kronke M. & Proksch E. (1999) Role for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J. Clin Invest.*, **104**, 1761-1770.
- Jones J.C.R., Goldman A.E., Steinert P.M., Yuspa S.H., Goldman R.D., The supramolecular organization of intermediate filaments networks in cultured epidermal cells. *Cell Motility*, 1982. **2**: 197-214.
- Jones P.H., Green H., Intermediate filament-plasma membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 1991. **3**: 127-132.
- Jones P.H., Watt M.F., Separation of human epidermal stem cells from transient amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 1993. **73**: 713-724.

BIBLIOGRAFIA

- Judge M.R., McLean W.H.I., Munro C.S. Disorders of keratinization. In: Burns T., Breathnach S. Cox C., Griffiths C. (eds) *Rook's Textbook of dermatology*, 2004. Vol 2. Blackwell Scientific Publishing, Oxford, pp 34.54-34.5.
- Kalinin A.E., Kajava A.V., Steinert P.M., Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified envelope. *BioEssay*, 2002. **24**: 789-800.
- Kaufman R.J.. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 2002. **110**:1389-1398
- Kern S.E., Kinzler K.W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C. & Vogelstein B. (1991) Identification of p53 as a sequence -pecific DNA-binding protein. *Science*, **252**, 1708-1710
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis:a basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, 1972. **26**: 239
- Kim I.G., McBride O.W., Wang M., Kim S.Y., Idler W.W., Steinert P.M., Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 7710-7717.
- Kim I.G., Gormanfi J.J., Park S.C., Chung S.I., Steinert P.M.,. The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse. *J Biol Chem*, 1993 **268**: 12682-12690.
- Kim H.C., Lewis J., Gorman J.J., Park S.C., Girand J.E., Folk J.E, Chung S.I., Protransglutaminase E from human guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem*, 1990.**265**: 21971-21978.
- Kim H.C., Idler W.W., Kim I.G., Han J.H., Chung S.H., Steinert P.M., The complete aminoacid sequence of the human transglutaminase K enzyme deduced from nucleic acid sequences of cDNA clones. *J Biol Chem*, 1991.**266**: 536-539.
- Kim H.C., Nemes Z., Idler W.W., Hyde C.C., Steinert P.M., Ahvazi B., Crystallization and preliminary X-ray analysis of human transglutaminase 3 from zymogen to active form. *J Struct Biol*, 2001.**135**: 73-77.
- Kim S.Y., Lee S.C., Lee J.H., Yang J.M., Chung S.L., Steinert P.M., Structure and organization of the human transglutaminase 3 gene: evolutionary relationship to the transglutaminase family. *J Invest Dermatol*, 1994.**103**: 137-142.
- Kim S.Y., Kim I.G., Chung S.I., Steinert P.M., The structure of the transglutaminase 1 enzyme. Deletion cloning reveals domains that regulate its specific activity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 1994a. **269**:27979-27986.

BIBLIOGRAFIA

- Kim S.Y., Chung S.I., Steinert P.M., Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 1995a.**270**: 18026-18035.
- Kim S.Y., Chung S.I., Yoneda K., Steinert P.M., Expression of transglutaminasi 1 in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 1995.**104**: 211-217.
- Kim S.Y., Grant P., Lee J.H., Pant H.C., Steinert P.M., Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 1999.**274**: 30715-30721.
- King K.E., Ponnampereuma R.M., Yamashita T., Tokino T., Lee L.A., Young M.F., Weinberg W.C. DeltaNp63alpha function as both a positive and a negative transcriptional regulator and blocks in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Oncogene*, 2003. 22: 3635-44
- Korner G., Schneider D.E., Purdon M.A., Bjornsson T.D., Bovine aortic endothelial cell transglutaminase. Enzyme characterization and regulation of activity. *Biochem J*, 1989. **262**: 633-641.
- Korsgren C., Cohen C.M., Purification and properties of human erythrocyte band 4.2. Association with the cytoplasmatic domain of band 3. *J Biol Chem*, 1986.**261**: 5536-5543.
- Korsgren C., Cohen C.M., Association of human erythrocyte band 4.2. *J Biol Chem*. 1988.
- Korsgren C., Lawler J., Lambert S., Speicher D., Cohen C.M., Complete aminoacid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990.**87**: 613-617.
- Koster M.I., Kim S., Mills A.A., Demayo F.J. & Roop D.R. (2004) p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.*, **18**, 126-131.
- Kowalczyk A.P., Stappenbeck T.S., Parry D.A., Palka H.L., Virata M.L., Bornslaeger E.A., Nilles L.A., Green K.J., Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys Chem*, 1994. **50**: 97-112.
- Kuramoto N., Takizawa T., Takizawa T., Matsuki M., Morioka H., Robinson J.M., Yamanishi K., Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1. *J Clin Invest*, 2002. **109**: 243-250.
- Kurban A.K., Azar H.A. Familial continual skin peeling. *Br J Dermatol*, 1969. **81**: 191-195

BIBLIOGRAFIA

- Ladiges W.C., Knoblaugh S.E., Morton J.F., Korth M.J., Sopher B.L., Baskin C.R., MacAuley A., Goodman A.G., LeBoeuf R.C., Katze M.G. Pancreatic β -cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58^{IPK}. *Diabetes*, 2005. **54**: 1074-1081
- Lane E.B., McLean W.H.I. Keratins and skin disorders. *J Pathol*, 2004. **204**: 355-366.
- Lai T.S., Slaughter T.F., Koropchak C.M., Haroon Z.A., Greenberg C.S., C-terminal deletion of human tissue transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *J Biol Chem*, 1996. **271**: 31191-31195.
- Lai T.S., Slaughter T.F., Peoples K.A., Hettasch J.M., Greenberg C.S., Regulation of human tissue transglutaminase function by magnesiumnucleotide complexes. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 1776-1781.
- Lavrijsen A.P.M., Bouwstra J.A., Gooris G.S. et al., Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*, 1995. **105**: 619-624.
- Lee H. & Kimelman D. (2002) A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell*, **2**, 607-627.
- Lee K.N., Birckbichler P.J., Patterson M.K.J., GTP hydrolysis by guinea pig liver transglutaminase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **162**: 1370-1375.
- Le Mouellic, H., Lallemand, Y. and Brulet, P. Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the E.coli lacZ in mouse chimeric embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990. **87**: 4712-4716
- Lee H. & Kimelman D. (2002) A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell*, **2**, 607-627.
- Levy S.B., Goldsmith L.A. The peeling skin syndrome. *J Am Acad Dermatol*, 1982. **7**: 606-613
- Lewanndoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Genetics Reviews*, 2001. **2**: 743-755.
- Lichti U., Ben T., Yuspa S.H., Retinoic acid-induced transglutaminase in mouse epidermal cells is distinct from epidermal transglutaminase. *J Biol Chem*, 1985. **260**: 1422-1426.
- Liew F.M., Yamanishi K., Regulation of transglutaminase 1 gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dexamethasone, and retinoic acid in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*, 1992. **202**: 310-315.
- Liu S., Cerione R.A., Clardy J., Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. **99**: 2743-2747.

BIBLIOGRAFIA

- Lorand L., Conrad S.M., Transglutaminases. *Mol Cell Biochem*, 1984. **58**: 9-35.
- Lorand L., Williams-Ashman H.G., *Acta Biochim Biophys*, 1987.**22**: 337-349.
- Lorand L., Barnes N., Bruner-Lorand J.A., Hawkins M., Michalska M., Inhibition of protein cross-linking in Ca²⁺ enriched human erythrocytes and activated platelets. *Biochemistry*, 1987.**26**: 308-313.
- Ma Y.Hendershot L. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nature Cancer Reviews*, 2004. **Vol.4**:966-977
- Mack J.W., Steven A.C., Steinert P.M., Mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments: the ionic zipper hypothesis. *J Mol Biol*, 1993.**232**: 50-66.
- MacMillan L.B., Hein L., Smith M.S. Central hypotensive effects of the alfa adrenergic receptor subtype. *Science*, 1996. **273**: 801-803.
- Madison, K.C. (2003) Barrier function of the skin: “la raison d’etre” of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 231-241.
- Marekov L.N., Steinert P.M., Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 17763-17770.
- Mariniello L., Esposito C., Caputo I., Sorrentino A., Porta R., Nterminus end of rat prostate transglutaminase is responsible for its catalytic activity and GTP binding. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**: 1098- 1108.
- Markova N., Chipew C.C., Marekov L., Idler W.W., Steinert P.M., Profilaggrin is major epidermal calcium binding protein. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**: 613-625.
- Martinet N., Beninati S., Nigra T.P., Folk J.E., N-(1-8)-Bis(g-glutamyl)spermidine crosslinking in epidermal cell envelopes. Comparison of crosslink levels in normal and psoriatic cell envelopes. *Biochem J*, 1990. **271**: 305-308.
- Matolsy A.G., Matolsy M.N., The membrane protein of horny cells. *J Invest Dermatol*, 1966. **46**: 127-129.
- Matolsy A.G., Matolsy M.N., The chemical nature of keratinocyte granules of the epidermis. *J Cell Biol*, 1970.**47**: 593-603.
- Matsuki M., Yamashita F., Yamamoto A.I., Yamada K., Kinoshita C., Fushiki S., Ueda E., Morishima Y., Tabata K., Yasuno H., Hashida M., Iizuka H., Ikawa M., Okabe M., Kondoh G., Kinoshita T., Takeda J., Yamanishi K., Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. **95**: 1044-1049.

BIBLIOGRAFIA

- Mehrel T., Hohl D., Rothnagel J.A., Longley M.A., Bundman D., Cheng C., Lichti U., Bisher M.E., Steven A.C., Steinert P.M., Yupsa S.H., Roop D.R., Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, 1990.**61**: 1103-1112.
- Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M., Piredda L., Candi E., Gentile V., Davis P.J., Piacentini M., Tissue Transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**: 6584-6596.
- Melton D.W. Gene targeting in the mouse. *Bioessays*, 1994. **16**: 633-638.
- Menon, J.K., Feingold K.R. & Elias P.M. (1992) Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.*, **98**, 279-289
- Mevorah B., Frenk E., Saurat J.H., Siegenthaler G. Peeling skin syndrome: a clinical, ultrastructural and biochemical study. *Br J Dermatol*, 1987. **116**: 117-125.
- Micanovic R., Procyk R., Lin W., Matsueda G.R., Role of histidine 373 in the catalytic activity of coagulation factor XIII. *J Biol Chem*, 1994. **269**: 9190-9194.
- Michel, S., Schmidt R., Shoroot, B & Reichert, U. (1988) Morphological and biochemical characterization of the cornified envelope from human epidermal keratinocytes of different origin. *J. Invest. Dermatol.*, **91**, 11-15
- Mills A.A., Zheng B.H., Wang X.J., Vogel H., Roop D.R. & Bradley A. (1999) p63 is a p53 homolog required for limb and epidermal morphogenesis, *Nature*, **398**, 708-713.
- Mischke D., Korge B.P., Marenholz I., Volz A., Ziegler A., Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*, 1996. **106**: 989-992.
- Mitelman F., Mertens F., Johansson. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat.Genet*, 1997. **15**. 417-474
- Molhuizen H.O., Alkemade H.A., Zeeuwen P.L., de Jongh G.J., Wieringa B., Schalkwijk J., SKALP/elafin: an elastase inhibitor from cultured human keratinocytes. Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase crosslinking. *J Biol Chem*, 1993.**268**: 12028- 12032.
- Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R., The catalog of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982. **31**: 11-24

BIBLIOGRAFIA

- Morse H.C. The laboratory mouse-A historical perspective . In the mouse biomedical research, Vol I:history,genetics and wild mice, pp1-16.*Academic Press, New York, NY,1981.*
- Muller U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mechanisms of Development*, 1999. **82**: 3-21.
- Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C., SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequence and structures. *J Mol Biol*, 1995.**247**: 536-540.
- Nakano K., Vousden K.H. PUMA , a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 2001. **7**: 683-694.
- Nanda N., Iismaa S.E., Owens W.A., Husain A., Mackay F., Graham R.M., Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 20673-20678.
- Nguyen M., Milar D.G., Yong V.W., Korsmeyer S.J., Shore G.C. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by COOH-terminal signal anchor sequence. *J.Biol.Chem*, 1993. **268**: 25265
- Nemes Z., Steinert P.M., Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*, 1999. **31**: 5-19.
- Nemes Z., Marekov L.N., Steinert P.M., Involucrin cross-linking by transglutaminase I. *J Biol Chem*, 1999a.**274**: 11013-11021.
- Nemes Z., Marekov L.N., Fesus L., Steinert P.M., A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain w-hydroxyceramides to involucrin by ester bound formation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 1999b.**96** :8402-8407.
- Nonomura K., Yamanishi K., Yasuno H., Nara K., Hirose S., Upregulation of elafin/SKALP gene expression in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 1994. **103**: 88-91.
- Nutt L.K., Pataer A., Pahler J., Fang B., Roth J., McConkey D.J., Swisher S.G. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*, 2002. **277**: 9219-9225.
- Oakes S.A., Scorrano L., Opferman J.T., Bassik M.C., Nishino M., Pozzan T., Korsmeyer S.J. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol triphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. **102**: 105-110.
- Ogawa H., Goldsmith L.A., Human epidermal transglutaminase. Preparation and properties. *J Biol Chem*, 1976. **251**: 7281-7288.
- Oh I.H., Reddy E.P., The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, 1999. **18**: 3017-3033.

BIBLIOGRAFIA

- O’Keele E.J., Hamilton E.H., Lee S.C. & Steinert P.M. (1993) Trichoyalin: a structural protein of hair, tongue, nail and epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 658-618
- 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 functionally and structurally resembles p53. *Nat. Med.*, **4**, 839-843.
- Paonessa G., Metafora S., Tajana G., Abrescia P., De Santis A., Gentile V., Porta R., Transglutaminase-mediated modifications of the rat sperm surface in vitro. *Science*, 1984. **226**: 852-855.
- Park G.T., Lim S.E., Jang S.I., Morasso M.I., Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursors. *J Biol Chem*, 2002. **277**: 45195-45202.
- Paigen K. A miracle enough: the power of mice. *Nature Med*, 1995. **1**: 215-220.
- Park S.C., Kim S.Y., Kim H.C., Thacher S., Chung S.I., Differential expression of transglutaminases in human foreskin and cultured keratinocytes. *J Cell Biol*, 1988. **107**: 139a.
- Parmentier L., Blanchette-Bardon C., Nguyen S., Prud’homme J.F., Dubertret L., Weissenbach J., Autosomal recessive lamellar ichthyosis: identification of a new mutation in transglutaminase 1 and evidence for genetic heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, 1995. **4**: 1391-1395.
- Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., McKeon F. & De Luca, M. (2001) p63 identifies keratinocytes stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3156-3161.
- Pfundt R., van Ruissen F., van Vijmen-Willems I.M., Akemade H.A., Zeeuwen P.L., Jap P.H., Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides antielastase defense in human epithelia. *J Clin Invest*, 1996.**98**: 1389-1399.
- Phillips M.A., Steware B.E., Qin Q., Chakravarty R., Floyd E.E., Jetten A.M., Rice R.H., Primary structure of keratinocyte transglutaminase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1990.**87**: 9333-9337.
- Piacentini M., Martinet N., Beninati S., Folk J.E., Free and proteinconjugated polyamines in mouse epidermal cells. *J Biol Chem*, 1988.**263**: 3790-3794.
- Pisano J.J., Finlayson J.S., Peyton M.P., Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: ϵ -(γ -glutamyl)lysine. *Science*, 1968.**160**: 892-893.
- Plewig G., Marples R.R., Regional differences of cell sizes in the human stratum corneum. Part 1. *J Invest Dermatol*, 1970. **54**: 13-18.

BIBLIOGRAFIA

- Polakowska R.R., Goldsmith L.A., The cell envelope and transglutaminases. In *Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of the Skin* (L.A. Goldsmith, ed.), 1991. pp. 168-201, Oxford University Press, New York, Oxford.
- Polakowska R.R., Herting E., Goldsmith L.A., Isolation of cDNA for human epidermal Type I transglutaminase. *J Invest Dermatol*, 1991. **96**: 285-288.
- Polgar L., Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. *FEBS Lett*, 1974. **47**: 15-18.
- Polgar L., Deuterium isotope effects on papain acylation. Evidence for lack of general base catalysis and for enzyme-leaving-group interaction. *Eur J Biochem*, 1979. **98**: 369-374.
- Porta R., Esposito C., De Santis A., Fusco A., Iannone M., Metafora S., Sperm maturation in human semen: role of transglutaminasemediated reactions. *Biol Reprod*, 1986. **35**: 965-970.
- Porta R., Esposito C., Gentile V., Mariniello L., Peluso G., Metafora S., Transglutaminase-catalyzed modifications of SV-IV, a major protein secreted from the rat seminal vesicle epithelium. *Int J Pept Protein Res*, 1990. **35**: 117-122.
- Porta R., Esposito C., Metafora S., Malorni A., Pucci P., Siciliano R., Marino G., Mass spectrometric identification of the amino donor and acceptor sites in a transglutaminase protein substrate secreted from rat seminal vesicles. *Biochemistry*, 1991. **30**: 3114-3120.
- Potter D.A., Tirnauer J.S., Janssen R., Croal D.E., Hughes C.N., Fiacco K.A., Mier J.W., Maki M., Herman I.M. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*, 1998. **141**: 647-662.
- Qian R.Q., Glanville R.W., Alignment of fibrillin molecules in elastic microfibrils is defined by transglutaminase-derived cross-links. *Biochemistry*, 1997. **36**: 15841-15847.
- Puthalakath H., Strasser A. Keeping killers on a tight leash:transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*, 2002. **9**:505
- Ramadan S., Terrinoni A., Catani M.V., Sayan A.E., Knight R.A., Mueller M., Krammer P.H., Melino G., Candi E. P73 induces apoptosis by different mechanisms. *Cell Death Diff*, 2005. **331**: 713-717.
- Ramirez-Solis R., Zheng H., Whiting J. Hoxb-4 mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell*, 1993. **73**: 279-294.
- Ramirez-Solis R., Liu P., Bradley A. Chromosome engineering in ice. *Nature*, 1995. **378**: 720-724.

BIBLIOGRAFIA

- Reichert U., Michel S., Schmidt R., The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In *Molecular biology of the Skin. The Keratinocyte*. (M. Darmon and M. Bloomenberg, eds), 1993.pp. 107-150, Academic Press, San Diego.
- Resing K.A., Dale B.A., & Walsh, K.A. (1985) Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides. *Biochemistry*, **24**, 4167-4175.
- Resing K.A., Dale B.A., & Walsh K.A. (1993) Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry*, **32**, 10036-10045
- Rice R.H., & Green H. (1977) The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked proteins. *Cell*. **11**, 417-422.
- Robertson E.J. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach. IRI Press, 1987, Oxford/Washington DC.
- Robinson N.A., Lopic S., Weter J.F., Eckert R.L., S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 12035-12046.
- Roth W., Deussing J., Bitchkarev V.A., Pauly-Evers M., Saftig P., Hafner A. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J*, 2000. **14**: 2075-2086.
- Russel L.J., Di Giovanna J.J., Hashem N., Compton J.G., Bale S.J., Linkage of Autosomal Recessive Lamellar Ichthyosis to Chromosome 14q. *Am J Hum Genet*, 1994. **55**: 1146-1152.
- Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, 1998. **14**: 381-392.
- Saunders N.A., Jetten A.M., Control of growth regulatory and differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes by interferon α . *J Biol Chem*, 1994. **269**: 2016-2022.
- Saurat J.M., Grosshans E., Laugier P., Lachapelle J.M., *Dermatologie et venerologie*. Editore Masson. Schalkwijk J., de Roo C., de Jongh G.J., 1991. Skin-derived antileuko proteinase (SKALP), an elastase inhibitor from human keratinocytes. Purification and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1096**. 148-154.

BIBLIOGRAFIA

- Schalkwijk J., van Vlijmen I.M., Alkemade J.A., de Jongh G.J., Immunohistochemical localization of SKALP/elafin in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 1993. **100**: 390-393.
- Shevchenko Y.O., Compton J.R., Toro J.R., DiGiovanna J.J., Bale S.J. Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families : molecular, genetic, genealogic and clinical studies. *Hum Genet* , 2000. **106**: 492-496.
- Schmuth M., Man M.Q., Weber F., Gao W., Feingold K.R., Fritsch P., Elias P.M. & Holleran W.M. (2000) Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 459-466.
- Schroeder M., Kaufman R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: 739-789
- Schroeder W.T., Thacher S.M., Stewart-Galetka S., Annarella M., Chema D., Siciliano M.J., Davies P.J.A., Tang H.Y., Sowa B.A., Duvic M., Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J Invest Dermatol*, 1992. **99**: 27-34.
- Schultz J., Ponting C.P., Hofmann K. & Bork P. (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.*, **6**, 249-253.
- Scorrano L., Oakes S.A., Opfermann J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, 2003. **300**: 135-139.
- Seitz J., Keppler C., Huntemann S.B., Purification and characterization of transglutaminases from the genital tract of the male rat. *J Chromatogr*, 1991. **587**: 55-60.
- Seong E., Saunders T., Stewart C.L., Burmeister. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends in Genetics*, Vol.20 No.2: 59-62.
- Shan L., Molberg O., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C., Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002. **297**: 2218-2220.
- Shevchenko Y.O., Compton J.G., Toro J.R., DiGiovanna J.J., Bale S.J., Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families : molecular, genetic, genealogic, and clinal studies. *Hum Genet*, 2000. **106**: 492-499.
- Scwayder T., Conn S., Lowe L. Acral peeling skin syndrome. *Arch Dermatol*, 1997. **133**: 535-536.

BIBLIOGRAFIA

- Silverman A.K., Ellis C.N., Beals T.F., Woo T.Y. Continual skin peeling syndrome. An electron microscopic study. *Arch Dermatol*, 1986. **122**: 71-75.
- Simon M., The epidermal cornified envelope and its precursors. In *The Keratinocyte Handbook* (I.M. Leigh, E.B. Lane and F.M. Watt, eds), 1994. pp. 275-292, Cambridge University Press, Cambridge.
- Singh U.S., Erickson J.W., Cerione R.A., Identification and biochemical characterization of an 80 kilodalton GTPbinding/ transglutaminase from rabbit liver nuclei. *Biochemistry*, 1995 **34**: 15863-15871.
- Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985. **317**: 230-234.
- Snouwaert J.N., Brisman K.K., Latour A.M., Malouf N.N., Boucher R.C., Smithies O. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science*, 1992. **257**: 1083-1088.
- Spina A.M., Esposito C., Pagano M., Chiosi E., Mariniello L., Cozzolino A., Porta R., Illiano G., GTPase and transglutaminase are associated in the secretion of the rat anterior prostate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **260**: 351-356.
- Stacey A., Schnieke A., McWhir J. Use of double replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**: 1009-1016.
- Stappenbeck T.S., Bornslaeger E.A., Corcoran C.M., Luu H.H., Virata M.L.A. et al., Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filaments networks. *J Cell Biol*, 1993 **123**: 691-706.
- Stappenbeck T.S., Lamb J.A., Corcoran C.M., Green K.J., Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *J Biol Chem*, 1994. **269**: 29351-29354.
- Steinert P.M., Cantieri J.S., Teller D.C., Lonsdale-Eccles J.D., Dale B.A., Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981. **78**: 4097-4101.
- Steinert P.M., Roop D.R., The molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*, 1988 **57**: 593-625.
- Steinert P.M., Mack J.W., Korge B.P., Gan Song-Qing, Haynes S.R., Steven A., Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int J Biol Macromol*, 1991. **13**: 130-139.

BIBLIOGRAFIA

- Steinert P.M., Marekov L.N., The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide crosslinked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 1995. **270**: 17702-17711.
- Steinert P.M., Chung S.I., Kim S.Y., Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocyte. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996a. **221**: 101-106.
- Steinert P.M., Kim S.Y., Chung S.I., Marekov L.N., The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 1996b. **271**: 26242-26250.
- Steinert P.M., Marekov L., Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 2021-2030.
- Steinert P.M., Candi E., Kartasova T., Marekov L.N., Small prolinerich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *J Struct Biol*, 1998a. **122**: 76-85.
- Steinert P.M., Candi E., Tarcsa E., Marekov L.N., Sette M., Paci M., Ciani B., Guerrieri P., Melino G., Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell Death Diff*, 1999. **6**: 916-930.
- Stewart M., Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 1990. **2**: 91-100.
- Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Cirman T., Snipas S.J., Ellerby L.M., Bredesen D. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 3149-3157.
- Stone S. J., Heather M.M., Steven M.W., Feingold K.R., Elias P.M. & Farese V.R. (2000) Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, **279**, 11767-11776
- Sun T., Green H., Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell*, 1976. **9**: 512-522.
- Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Kitko D.J., et al., Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 1989. **92**: 251-257.
- Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 2006. **Vol.7 No.9**: 880-885

BIBLIOGRAFIA

- Szondy Z., Sarang Z., Molnar P., Nemeth T., Piacentini M., Mastroberardino P.G., Falasca L., Aeschlimann D., Kovacs J., Kiss I., Szegezdi E., Lakos G., Rajnavolgyi E., Birckbichler P.J., Melino G., Fesus L., Transglutaminase 2 -/- mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2003. **100**: 7812-7817.
- Talukder A.H., Wang R., Kumar R. Expression and transactivating functions of the bZIP transcription factor GADD153 in mammary epithelial cells. *Oncogene*, 2002. **21**: 4289-4300
- Takaesu N.T., Lower J.A., Yelon D. In vivo functions mediated by the p41 isoform of the MHC class II-associated invariant chain. *J Immunol*, 1997. **6**:349-356.
- Takahashi M., Tezuka T., The cystine-rich envelope protein from human epidermal stratum corneum cells. *J Invest Dermatol*, 1987. **88**: 47-51.
- Tarcsa E., Candi E., Kartasova T., Idler W.W., Marekov L.N., Steinert P.M., Structural and transglutaminase substrate properties of the small proline rich 2 family of cornified cell envelope proteins. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 23297-23303.
- Tarkowski A.K. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature*, 1961. **190**: 857-860.
- Terrinoni A., Ranalli M., Cadot B., Leta A., Bagetta G., Vousden K.H., Melino G. p73-alpha is capable of inducing scotin and ER stress. *Oncogene*, 2002. **23**: 3721-3725.
- Thacher S.M., Rice R.H., Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: regulation of crosslinked envelope formation and terminal differentiation. *Cell*, 1985. **40**: 685-695.
- Thibaut S., Candi E., Pietroni V., Melino G., Schmidt R., Bernard B.A. Transglutaminase 5 expression in human hair follicle. *J Invest Dermatol*, 2005. **125** (3): 581-585.
- Thomas K.R., and Capecchi M.R. Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987. **51**: 503-512.
- Thomazy V., Fesus L. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 1989. **255**(1): 215-24.
- Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995 **267**:1456
- Thornberry N.A., and Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science*, 1998. **281**:1312
- Tirasophon W., Welihinda A.A., Kaufman R.J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional

BIBLIOGRAFIA

- protein kinase/ endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*, 1998. **12**: 1812-1824.
- Toth L.R., Smith T.J., Jones C. Two distinct apolipoprotein B alleles in mice generated by a single “in-out” targeting. *Gene*, 1996. **178**:161-168.
- Traupe H. The ichthyoses. A guide to clinical diagnosis, genetic counselling, and therapy. Springer-Verlag, Berlin 1969.
- Tucholski J., Kuret J., Johnson G.V., Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J Neurochem*, 1999. **73**: 1871-1880.
- Turk B., Stoka V., Rozman-Pungercar J., Cirman T., Droga-Mazovec G., Oreic K., Turk V. Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem*, 2002. **383**:1035-1044
- Uitto J., Richard G. Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2004. **131**: 61-74.
- Valancius V., Smithies O. Testing an “in-out” targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**: 1402-1408.
- van Doorninck J.H., french P.J., Verbeek E. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J*, 1995. **14**: 4403-4411.
- Vinson C.R., Hai T., and Boyd S.M. *Genes Dev*, 1993. **7**: 1047-1058
- Vikstrom K.L., Borisy G.G., Goldman R.D., Dynamic aspects of intermediate filament networks in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1989.**86**: 549-553.
- Vogelstein B., Lane D. &Levine A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-310.
- Volz A., Korge B.P., Compton J.C., Ziegler A., Steinert P.M., Mischke D., Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*, 1993. **18**: 92-99.
- Wang X.Z., Harding H.P., Zhang Y., Jolicoeur E.M., Kuroda M., Ron D. Cloning of mammalian Ire1, reveals diversity in the ER stress response. *EMBO J*, 1998. **17**: 5708-5717
- Wang M., Kim I.G., Steinert P.M., McBride O.W., Assignment of the human transglutaminase 2 (TGM2) and transglutaminase 3 (TGM3) genes to chromosome 20q11.2. *Genomics*, 1994. **23**: 721-722.
- Wei M.C., et al. Pro-apoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunctions and death. *Science*, **2001**. 292: 727-730
- Weiss M.S., Jabs A., Hilgenfeld R., Peptide bonds revisited. *Nat Struct Biol*, 1998a. **5**: 676.

BIBLIOGRAFIA

- Weiss M.S., Metzner H.J., Hilgenfeld R., Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Lett*, 1998b. **423**: 291-296.
- Westfall M.D., Mays D.J., Sniezek J.C. & Pietenpol J.A. (2003) DNp63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3s promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutation. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 2264-2276.
- Whyatt L.M., Rathjen P.D. Introduction of precise alterations into the mouse genome with high efficiency by stable tag-exchange gene targeting: implications for gene targeting in ES cell. *Nucl Acids Res*, 1997. **25**: 2381-2388.
- Williams-Ashman H.G., Transglutaminases and the clotting of mammalian
- Wong E.A., Capecchi M.R. Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat Cell Mol Genet*, 1986. **12**: 63-72.
- Wu H., Liu X., Jaenisch R. Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Colla-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. **91**: 2819-2823.
- Yada Y., Polakowska R.R., Okano Y., Nozawa Y., Protein kinase C dependent expression of type I transglutaminase mRNA in ganglioside GQ1b and calcium-stimulated human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **190**. 688-694.
- Yaffe M.B., Beegen H., Eckert R.L., Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 12233-12238.
- Yamada H., Takamori K., Ogawa H., Localization and some properties of skin sulfhydryl oxidase. *Arch Dermatol Res*, 1987. **279**: 194-197.
- Yamada K., Yamanishi K., Kakizuka A., Kibe Y., Doi H., Yasuno H., Transcriptional regulation of human transglutaminase 1 gene by signaling systems of protein kinase C, RAR/RXR and Jun/Fos in keratinocytes. *Bioch Mol Biol Intern*, 1994. **34**: 827-836.
- Yamada K., Matsuki M., Morishima Y., Ueda E., Tabata K., Yasuno H., Suzuki M., Yamanishi K., Activation of human transglutaminase 1 promoter in transgenic mice: terminal differentiation-specific expression of the TMG1-LacZ transgene in keratinized stratified squamous epithelia. *Hum Mol Gen*, 1997. **6**:2223-2231.

BIBLIOGRAFIA

- Yamanishi K., Inazawa J., Liew F.M., Nonomura K., Ariyama T., Yasuno H., Abe T., Doi H., Hirano J., Fukushima S., Structure of the gene for human transglutaminase I. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 17858-17863.
- Yan W., Frank C.L., Korth M.J., Sopher B.L., Novoa I., Ron D., Katze M.G. Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P581PK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. **99**:15920-15925.
- Yan Z.H., Noonan S., Nagy L., Davies P.J., Stein J.P., Retinoic acid induction of the tissue transglutaminase promoter is mediated by a novel response element. *Mol Cell Endocrinol*, 1996.**120**: 203-212.
- Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson R., Tabin C., Sharpe A., Caput D., Crum C. & McKeon F. (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, **398**, 714-718.
- Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillet M., Fleming V., Dotsch V., Andrews N., 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*, **2**, 305-316.
- Yee V.C., Pedersen L.C., LeTrong I, Bishop P.D., Stenkamp R.E., Teller D.C., Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. **91**: 7296-7300.
- Yee V.C., Le Trong I, Bishop P.D., Pedersen L.C., Stenkamp R.E., Teller D.C., Structure and function studies of factor XIIIa by x-ray crystallography. *Semin Thromb Hemost*, 1996. **22**: 377-384.
- Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001. **107**: 881-891.
- Yu Y., Bradley A. Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nature Genetics Reviews*, 2001. **2**: 780-790.
- Yuan Y., Dopheide S.M., Ivanidis C., Salem H.H., Jackson S.P. Calpain regulation of cytoskeletal signalling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein Iib-IIIa (integrin alphaIIbeta3)in von Willebrand factor-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 21487-21854.
- Yuspa S.H., Kilkenny, A. E., Steinert, P. M. Roop, D. R. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*, 1989. **109**: 1207-17.

BIBLIOGRAFIA

- Zatloukal K., Denk H., Lackinger E., Rainer I., Hepatocellular cytokeratins as substrates of transglutaminases. *Lab Invest*, 1989. **61**: 603-608.
- Zavalova L., Lukyanov S., Baskova I., Snezhkov E., Akopov S., Berezhnoy S., Bogdanova E., Barsova E., Sverdlov E.D., Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo- α (β -glutamyl)lysine isopeptide bonds and help to dissolve blood clots. *Mol Gen Genet*, 1996. **253**: 20-25.
- Zhaoyu J., El-Deiry W.S. Overview of cell death signalling pathways. *Cancer Biol & Ther*, 2005. **4**: 139-163
- Zhou X.M., Idler W.W., et al., The complete sequence of the human intermediate filament chain keratin 10. *J Biol Chem*, 1988. **263**: 15584-15589.
- Zinsszner H., Kuroda M., Wang X., Batchvarova N., Lightfoot R.T., Remotti H., Stevens J.L., Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 1998. **12**: 982-995

,

CURRICULUM E PUBBLICAZIONI

CURRICULUM VITAE

Nome	Loredana
Cognome	Zocchi
Data di nascita	06-05-1978, Roma (Italia)
e-mail	loredana.zocchi@uniroma2.it

Istruzione e formazione**Nov.2003-Ott.2007**

Dottorato di Biochimica e Biologia Molecolare presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Roma "**Tor Vergata**". Titolo: "Studio funzionale della transglutaminasi 3 e di p63 nel differenziamento epidermico mediante l'uso di modelli murini"

Supervisor del progetto: *Prof.G. Melino* e *Dott. A. Terrinoni*

Dic.2003

Abilitazione alla professione di Biologo presso l'Università di Roma "**Tor Vergata**"

Nov.1997-Mag.2003

Laurea in *Scienze Biologiche* con indirizzo biotecnologico conseguita presso l'Università degli Studi di Roma "**La Sapienza**" con votazione 110/110 con lode. Tesi di laurea in *Biologia Molecolare Vegetale* con argomento "Caratterizzazione funzionale di *AtBBF1*, un fattore di trascrizione Dof di *Arabidopsis*

thaliana". Supervisore del progetto:
Prof. P. Costantino e *Dott. G. Serino*

Esperienze professionali

1999-2000

Borsa di collaborazione presso il Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo museo di Anatomia Comparata all'Università di Roma "La Sapienza" **Prof. E. Capanna**

Tecniche acquisite

Biologia molecolare: estrazioni di DNA ed RNA da tessuti vegetali ed animali; clonaggio di DNA; digestione ed estrazione del DNA; analisi di sequenza; PCR ed RT-PCR; PCR quantitative; Southern, Northern e Western blot

Biologia cellulare: trasfezioni e colture cellulari (primarie e secondarie); immunofluorescenze su tessuti e cellule; microscopia confocale (Nikon ECZ1 system); dosaggio dell'attività transglutaminasica *in vitro*; stabulazione.

Publicazioni Scientifiche

1. **Zocchi L.**, Bourdon J.C., Codispoti A., Knight R., Lane D.P., Terrinoni A., Melino G. “**Scotin: a new p63 target gene expressed during the epidermal differentiation**” In submission:

2. **Zocchi L.**, Terrinoni A., Candi E., Ahvazi B., Bagetta G., Corasaniti M.T., Lena A., Melino G. “**Identification of transglutaminase 3 splicing isoforms**”. *J Invest Dermatol* 2007 Jul; 127 (7):1791-4

Poster

Zocchi L., Gualberti G., Serino G., Costantino P., Vittorioso P. “**Caratterizzazione funzionale di AtBBF1, codificante una proteina Dof di Arabidopsis thaliana, mediante analisi genetica e fisiologica del mutante inserzionale atbbf1-I**” 4° Convegno FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita) Riva del Garda (TN) 20-23 Settembre 2002

Zocchi L., Terrinoni A., G.Melino “**Creazione di topi knock-out condizionali per la Transglutaminasi 3**” I° Simposio dei Dottorandi “Proteine al Lavoro” Villa Mondragone (Roma) 12-05-2006

Terrinoni A., Didona B., Codispoti A., **Zocchi L.**, Melino G. “**The novel Connexin 26 Gly11Glu heterozygous mutation is responsible of a case of KID Syndrome, via the impairment of membrane trafficking and connexon assembly**” SID Maggio 2006 Philadelphia (PA)

Zocchi L., Lena A.M., Codispoti A., Terrinoni A., Melino G. and Candi E. “**Transglutaminases and their role in the pathogenesis of lamellar ichthyosis and acral peeling skin syndrome**” XIV Scientific Convention Telethon Salsomaggiore terme (PR) 12-14 Marzo 2007

Zocchi L., Bourdon J.C., Terrinoni A., and Melino G: “**Apoptosis by p63/p73 via Scotin and ER stress**” Fifth Tuscany Retreat on Cancer Research Sarteano 18-25 Agosto 2007

Staurianeas³ and Theoharis C. Theoharides^{1,4,5,6}

¹Departments of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Tufts University School of Medicine, Tufts-New England Medical Center, Boston, Massachusetts, USA; ²Allergy Division, Attikon Hospital, University of Athens Medical School, Athens, Greece; ³Department of Dermatology, Attikon Hospital, University of Athens Medical School, Athens, Greece; ⁴Department of Biochemistry, Tufts University School of Medicine, Tufts-New England Medical Center, Boston, Massachusetts, USA; ⁵Department of Internal Medicine, Tufts University School of Medicine, Tufts-New England Medical Center, Boston, Massachusetts, USA and ⁶Department of Psychiatry, Tufts University School of Medicine, Tufts-New England Medical Center, Boston, Massachusetts, USA.
E-mail: theoharis.theoharides@tufts.edu

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Methods.

Table S1. Characteristics of subjects providing the skin samples.

REFERENCES

Cao J, Papadopoulos N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL *et al.* (2005) Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 174:7665-75

Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351-62

Crompton R, Clifton VL, Bisits AT, Read MA, Smith R, Wright IM (2003) Corticotropin-releasing hormone causes vasodilation in human skin via mast cell-dependent pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5427-32

Dhabhar FS, McEwen BS (1999) Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1059-64

Donelan J, Marchand J, Kempuraj D, Papadopoulos N, Theoharides TC (2006) Perifollicular and perivascular mouse skin mast cells

express corticotropin-releasing hormone receptor. *J Inv Dermatol* 126:929-32

Galli SJ, Nakaie S, Tsai M (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-42

Kaneko K, Kawana S, Arai K, Shibasaki T (2003) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 is involved in the stress-induced exacerbation of chronic contact dermatitis in rats. *Exp Dermatol* 12:47-52

Karalis K, Louis JM, Bae D, Hilderbrand H, Majzoub JA (1997) CRH and the immune system. *J Neuroimmunol* 72:131-6

Katsarou-Katsari A, Filippou A, Theoharides TC (1999) Effect of stress and other psychological factors on the pathophysiology and treatment of dermatoses. *Int J Immunopathol Pharmacol* 12:7-11

Kempuraj D, Papadopoulos NG, Lytinas M, Huang M, Kandere-Grzybowska K, Madhapan B *et al.* (2004) Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology* 145:43-8

Lytinas M, Kempuraj D, Huang M, Boucher W, Esposito P, Theoharides TC (2003) Acute stress results in skin corticotropin-releasing hormone secretion, mast cell activation and vascular permeability, an effect mimicked by intradermal corticotropin-releasing hormone and inhibited by histamine-1 receptor antagonists. *Int Arch Allergy Immunol* 130:224-31

O'Kane M, Murphy EP, Kirby B (2006) The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. *Exp Dermatol* 15:143-53

Papadopoulos NG, Oleson L, Kempuraj D, Donelan J, Cetrulo CL, Theoharides TC (2005) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor-2 expression in human cord blood-derived cultured mast cells. *J Mol Endocrinol* 35:R1-8

Paus R, Theoharides TC, Arck PC (2006) Neuro-immunoendocrine circuitry of the "brain-skin connection". *Trends Immunol* 27:32-9

Richards HL, Ray DW, Kirby B, Mason D, Plant D, Main CJ *et al.* (2005) Response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to psychological stress in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 153:1114-20

Roloff B, Fechner K, Slominski A, Furkert J, Botchkarev VA, Bulfone-Paus S *et al.* (1998)

Hair cycle-dependent expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptors in murine skin. *FASEB J* 12:287-97

Rozniecki JJ, Dimitriadou V, Lambracht-Hall M, Pang X, Theoharides TC (1999) Morphological and functional demonstration of rat dura mast cell-neuron interactions *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res* 849:1-15

Saraceno R, Kleyn CE, Terenghi G, Griffiths CE (2006) The role of neuropeptides in psoriasis. *Br J Dermatol* 155:876-82

Schon MP, Boehncke WH (2005) Psoriasis. *N Engl J Med* 352:1899-912

Singh LK, Pang X, Alexacos N, Letourneau R, Theoharides TC (1999) Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin and substance P: a link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav Immunity* 13:225-39

Slominski A, Ermak G, Mazurkiewicz JE, Baker J, Wortsman J (1998) Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1020-4

Slominski A, Wortsman J (2000) Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev* 21:457-487

Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 80:979-1020

Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE *et al.* (2001) Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J* 15:1678-93

Theoharides TC, Cochrane DE (2004) Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol* 146:1-12

Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulos N, Cao J, Kempuraj D, Conti P (2004) Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci* 25:563-8

Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E *et al.* (1998) Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its pro-inflammatory effects. *Endocrinology* 139:403-13

Identification of Transglutaminase 3 Splicing Isoforms

Journal of Investigative Dermatology (2007) **127**, 1791-1794; doi:10.1038/sj.jid.5700768; published online 22 March 2007

TO THE EDITOR

Transglutaminases (TGs) are a family of nine Ca²⁺-dependent enzymes (types

1-7, band 4.2, factor XIII) that catalyze cross-linking reaction resulting in the formation of an N^ε-(γ-glutamyl lysine)

isopeptide bond between their substrates (Griffin *et al.*, 2002; Lorand and Graham, 2003; Esposito and Caputo, 2005). TG-modified proteins are more resistant to proteolytic degradation and

Abbreviations: TG, Transglutaminase; hTG3, human TG3

play a role in different biological processes such as bone ossification and cell-matrix interactions (TG2), blood coagulation (factor XIII), semen clotting (TG4), and epithelial differentiation (TG1, TG3, and TG5) (Kim *et al.*, 1995b; Candi *et al.*, 2002; Lorand and Graham, 2003; Candi *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 2005). Four members (types 1–3, and 5) expressed in stratified squamous epithelia such as the epidermis, and during the differentiation process, are responsible for the formation of the cornified cell envelope (Kalinin *et al.*, 2002; Candi *et al.*, 2005). TG1 enzyme is expressed all over the epidermis (from the lower to the upper layers); the enzyme becomes highly active on proteolytically processing, which occurs in the upper layers of the epidermis. TG1 cross-links structural proteins, including involucrin, loricrin, and small proline-rich proteins, mutations abolishing its activity cause lamellar ichthyosis (MIM 242300) in human, whereas TG1 $-/-$ mice die soon after birth owing to incomplete barrier function of the skin (Matsuki *et al.*, 1998; Kuramoto *et al.*, 2002). TG5 (Grenard *et al.*, 2001) is expressed in the upper layers of human epidermis (Candi *et al.*, 2002) and in human hair follicle (Thibaut *et al.*, 2005), mutations abolishing its activity are associated to acral peeling skin syndrome (MIM 609796) in human (Cassidy *et al.*, 2005). TG3 is expressed in the epidermis in the late differentiation stages (Kim *et al.*, 1995a; Lee *et al.*, 1996) and in the inner root sheath and in the medullary layers of hair follicles, as well as in the stomach, brain, and testis (Hitomi *et al.*, 2001). The native TG3 protein has a molecular mass of 77 kDa, both in human and mice, it is proteolytically activated in a 47-kDa component, containing the catalytic core and a 30-kDa fragment (Ahvazi *et al.*, 2003, 2004a). Recently, it has been shown that, at least *in vitro*, cathepsin L is able to cleave and activate TG3 (Cheng *et al.*, 2006). TG3, similar to TG1 and TG5, crosslinks small proline-rich proteins, loricrin, and involucrin during the formation of the cell envelope. *In vivo* and *in vitro* data show that these enzymes (TG1, TG3, and TG5) use different glutamine and lysine residues

(Hitomi *et al.*, 2001) in the same protein substrate, indicating that they act synergistically to generate a functional cell envelope. To date, no mutations or disease are associated with TG3. Finally, TG3 also seems involved in signal transduction and, like two other TGs (TG2 and TG5), is able to bind and hydrolyze guanosine triphosphate (Liu *et al.*, 2002; Ahvazi *et al.*, 2003; Ahvazi *et al.*, 2004a,b; Candi *et al.* (2004)).

To study further the role of TG3 in human and mouse skin (Institutional approval of experiments and informed consent of patients was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki Principles), we detected the presence of a new splicing variant (Figure 1a), lacking exons 6 and 7 ($\Delta 6,7$) in mouse. The ablation of these exons generates a new joining between exons 5 and 8 with a shift in the original reading frame, leading to the translation of six new amino acids in exon 8 (Figure 1b), followed by a premature stop codon. The new splicing variant does not contain an important portion of the catalytic site, as the catalytic cysteine is located in exon 6. The sequence analysis of flanking intron

sequence did not show any mutation at the donor and the acceptor-splicing site (data not shown). A specific PCR analysis of other mouse strains demonstrate the presence of the truncated $\Delta 6,7$ isoform (data not shown). These results demonstrated that the $\Delta 6,7$ -splicing variant originates during the hnRNA processing and is not because of a genomic mutation.

Furthermore, we also detected the presence of a human TG3 (hTG3) variant during the cloning of hTG3 cDNA. We observed the presence in 10% of the clones of a TG3 variant lacking exons 9 and 10 ($\Delta 9,10$). The ablation of these exons did not affect the original reading frame (Figure 1d); therefore, this new variant has the same C-terminal end of the wild-type enzyme. The presence of the $\Delta 9,10$ hTG3 was confirmed by semi quantitative PCR (Figure 1e), using cDNAs obtained from differentiating normal human epidermal keratinocytes and from skin biopsies of normal individuals and lamellar ichthyosis patients. As shown in Figure 1e, we did not detect a relevant difference of expression among wild type and $\Delta 9,10$ TG3.

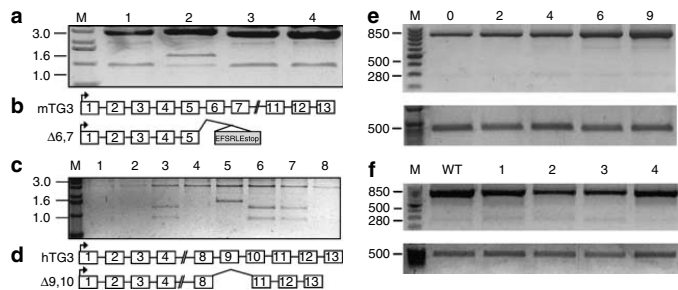


Figure 1. Cloning and detection of mouse and hTG3-splicing variants. (a) *EcoRI* digestion of mouse TG3 (mTG3) in lanes 1, 3, and 4. The $\Delta 6,7$ variant is represented by one band of 970 bp; in lane 2, two bands of 920 bp, and 1,290 bp represents a wild-type (Wt) colony; the 3 kbp band is the empty vector (amplification primers + ACACCATCTGTGTCATTCCC, -CTGGACAACATAGGCAACA). (b) Schematic representation of mTG3-splicing variant. The gray box indicates the new six amino acids and the premature stop codon. (c) *EcoRI* digestion of hTG3, in lanes 3, 6, and 7; two bands of 840 and 1,270 bp represents the Wt colonies, in lane 5 the band of 1,550 bp represents the $\Delta 9,10$ variant (amplification primers + CTGAGAAGAGGCAGAGGAAGG, -TCATTCCGGCTACATCGATGGAC). (d) Schematic representation of hTG3-splicing variant. (e) Semi-quantitative reverse transcription-PCR on differentiated normal human epidermal keratinocyte (0, 2, 4, 6, and 9 days with 1.2 mM Ca^{2+}). The upper panel shows the amplification of hTG3. The high-molecular-weight band is the Wt amplification (850 bp), whereas the lower one is the spliced isoform (290 bp). The lower panel shows the housekeeping β -actin. (f) Semi-quantitative reverse transcription-PCR on RNA extracted from skin biopsies of normal (Wt) and lamellar ichthyosis individuals (lanes 1, 2, 3, and 4). The upper panel is the Wt band, the lower band represents the spliced isoform, in the lower panel is shown the housekeeping (β -actin) (hTG3 primers: + ATGACACAGACCAGAAATCT, -ATCATCTGGGACCTTGC).

Guanosine triphosphatase activity is lost both in mouse and human spliced isoforms ($\Delta 6,7$; $\Delta 9,10$), because the essential residues for such enzymatic activity are located in the skipped exons. However, the human $\Delta 9,10$ -splicing variant still retains the crosslinking activity. *In vitro* measurement of the crosslinking activity (Figure 2a, left panel) demonstrated about four fold reduction of activity in comparison with wild-type enzyme. This is probably because of the lack of isoform of the second Ca^{2+} -binding site in the $\Delta 9,10$, important for the activation of the enzyme, as evaluated by the computer modelling (Figure 2c-d).

Several studies reported that alternative splicing is a common phenomenon in mammalian genomes, affecting between 35 and 59% of all human genes. These mRNA variants could be considered "functional" when they are differentially expressed and regulated in support of specific functions of cellular metabolism and "not functional" when they are mostly produced from a partial or inefficient processing of nuclear RNA (hnRNA). In this paper, we describe the isolation and characterization of two novel TG3-splicing variants. The analysis of *in vitro* differentiating keratinocytes, skin biopsies from normal controls, and from lamellar ichthyosis patients showed that there is no significant difference in the expression of the $\Delta 9,10$ hTG3 variant. *In vitro* Western blot experiments revealed that the $\Delta 9,10$ protein variant transfected in HEK293 cells is expressed at lower level in comparison with the wild-type protein (Figure 2b). This is probably because of protein instability of the $\Delta 9,10$ variant, as semi-quantitative PCR analysis demonstrated the same level of transcription (Figure 2a, right panel).

In conclusion, we detected two splicing variants for TG3, as the transcription of these mRNAs appears to be not regulated during differentiation and in pathologies involving transglutaminase activity (such as lamellar ichthyosis), we believe that they do not have a physiological role and it is possible to speculate that they originate from an error of the spliceosome complex. Considering the low frequency of these errors (Graveley, 2001), the existence

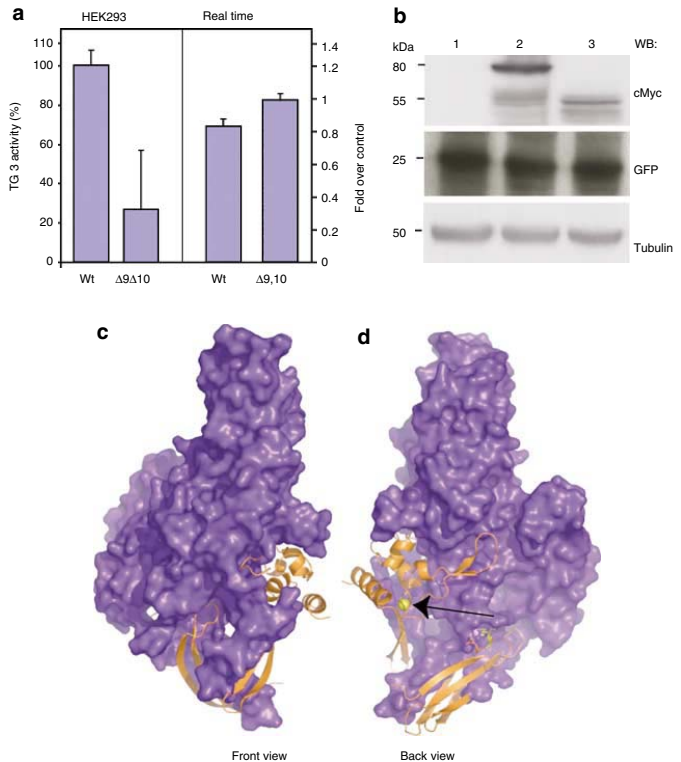


Figure 2. Modelling and crosslinking activity of 9,10 hTG3 isoform. (a) Left panel: crosslinking activity measurements of Wt and $\Delta 9,10$ hTG3 proteins; right panel: quantitative reverse transcription-PCR on HEK-293-transfected cells (primers hTG3: +TATCAGATCTCCAGTCCTGCC, -GCCAATTCGGTTTGTGCTTCC; green fluorescent protein: +GCTGACCTGAAGTTCATCTG, -TCTGTAGTTGCCGTCGTC on ABI 7500 + SYBRII). (b) Western blot on transfected HEK-293 cells, using anti-myc tag antibody, for TG3 Wt (80 kDa, lane 1) and $\Delta 9,10$ (55 kDa, lane 2) empty vector (lane 3). Housekeeping normalization, β -tubulin; transfection efficiency normalization, green fluorescent protein. (c) Front and (d) back view of a model hTG3, the images are rotated 180° with respect to each other. The orange protein regions represent the portions missed by $\Delta 9,10$ alternative splicing. The yellow circle (arrow) inside the orange region is the Ca^{2+} ion inside the Ca^{2+} second binding site.

of TG1, TG2, and TG5 of splicing variants in human (Aeschlimann *et al.*, 1998; Shevchenko *et al.*, 2000; Candi *et al.*, 2001; Citron *et al.*, 2001) is probably because of a high degree of sequence similarity and gene organization (Grenard *et al.*, 2001) within the TG family. The identification and characterization of these two splicing variants for TG3 will contribute to complete the knowledge in the field.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by EU-Grants EPISTEM (LSHB-CT-019067), IMPALED (QLK3-

CT-2002-01956); FIRB-Grants RBNE01KJHT_004, RBNE01NWC_H_008; MIUR/PRIN 004064744_003; AIRC rif. 1338; ISS no. 530/F-A19. The work was also supported by Grant Telethon GGP04110 to GM and Grant Telethon GGP06048 to EC. The Intramural Research Program of the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the National Institutes of Health to BA.

Loredana Zocchi¹, Alessandro Terrinoni¹, Eleonora Candi¹, Bijan Ahvazi², Giacinto Bagetta³, M. Tiziana Corasaniti^{4,5}, Anna M. Lena^{3,1} and Gerry Melino^{1,6}

¹Biochemistry Laboratory, Istituto Dermatologico Immacolata (IDI-IRCCS), University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy; ²X-ray Crystallography Facility/Office of Science and Technology, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National

Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; ³Department of Pharmacobiology, University of Calabria, Arcavacata di Rende, Cosenza, Italy; ⁴Department of Pharmacological Sciences, University "Magna Graecia", Catanzaro, Italy; ⁵"Mondino-Tor Vergata" Center for Experimental Neuropharmacology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy and ⁶Toxicology Unit, Medical Research Council, Leicester University, Leicester, UK E-mail: melino@uniroma2.it

REFERENCES

Aeschlimann D, Koeller MK, Allen-Hoffmann BL, Mosher DF (1998) Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. Detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Biol Chem* 273:3452-60

Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM (2003) Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *J Biol Chem* 278:23834-41

Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM, Rastinejad F (2004a) Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *J Biol Chem* 279:7180-92

Ahvazi B, Boeshans KM, Rastinejad F (2004b) The emerging structural understanding of transglutaminase 3. *J Struct Biol* 147:200-7

Candi E, Oddi S, Paradisi A, Terrinoni A, Ranalli M, Teofoli P et al. (2002) Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J Invest Dermatol* 119:670-7

Candi E, Oddi S, Terrinoni A, Paradisi A, Ranalli M, Finazzi-Agro A et al. (2001) Transglutaminase 5 cross-links loricerin, involucrin, and small proline-rich proteins *in vitro*. *J Biol Chem* 276:35014-23

Candi E, Paradisi A, Terrinoni A, Pietroni V, Oddi S, Cadot B et al. (2004) Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides. *Biochem J* 381:313-9

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

Cassidy AJ, van Steensel MA, Steijlen PM, van Geel M, van der Velden J, Morley SM et al. (2005) A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet* 77:909-17

Cheng T, Hitomi K, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Yamamoto K, Nishi K et al. (2006) Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem* 281:15833-9

Citron BA, SantaCruz KS, Davies PJ, Festoff BW (2001) Intron-exon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:3295-301

Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA (2005) Transglutaminases in epidermis. *Prog Exp Tumor Res* 38:115-24

Esposito C, Caputo I (2005) Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. *FEBS J* 272:615-31

Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17:100-7

Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D (2001) Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J Biol Chem* 276:33066-78

Griffin M, Casadio R, Bergamini CM (2002) Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 368:377-96

Hitomi K, Horio Y, Ikura K, Yamanishi K, Maki M (2001) Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 33:491-8

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

Kim SY, Chung SI, Steinert PM (1995a) Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 270:18026-35

Kim SY, Chung SI, Yoneda K, Steinert PM (1995b) Expression of transglutaminase 1 in human epidermis. *J Invest Dermatol* 104:211-7

Kuramoto N, Takizawa T, Takizawa T, Matsuki M, Morioka H, Robinson JM et al. (2002) Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1. *J Clin Invest* 109:243-50

Lee JH, Jang SI, Yang JM, Markova NG, Steinert PM (1996) The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. Stratified squamous epithelial-specific expression in cultured cells is mediated by binding of Sp1 and ets transcription factors to a proximal promoter element. *J Biol Chem* 271:4561-8

Liu S, Cerione RA, Clardy J (2002) Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2743-7

Lorand L, Graham RM (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:140-56

Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S et al. (1998) Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1044-9

Shevchenko YO, Compton JG, Toro JR, DiGiovanna JJ, Bale SJ (2000) Splice-site mutation in TGM1 in congenital recessive ichthyosis in American families: molecular, genetic, genealogical, and clinical studies. *Hum Genet* 106:492-9

Thibaut S, Candi E, Pietroni V, Melino G, Schmidt R, Bernard BA (2005) Transglutaminase 5 expression in human hair follicle. *J Invest Dermatol* 125:581-5

Effects of UVB Irradiation and Diclofenac on F₂-Isoprostane/Prostaglandin Concentrations in Keratinocytes and Microdialysates of Human Skin

Journal of Investigative Dermatology (2007) **127**, 1794-1797; doi:10.1038/sj.jid.5700756; published online 1 March 2007

TO THE EDITOR

UVB irradiation of the skin induces a complex cascade of acute inflamma-

tion, characterized by erythema, edema, and immunosuppression and is according to chronic exposure subse-

quently linked to the initiation and progression of skin cancer (Matsumura and Ananthaswamy, 2004). The role of inflammatory mediators in skin diseases is of critical importance. This includes

Abbreviations: F₂-IsoPs, F₂-isoprostanes; DCLF, diclofenac; COX, cyclo-oxygenase

