

DI

Direttore: Prof. Gerry Melino
tel. **06.20.42.72.99**

PERSONALE

Prof. Gerry Melino, direttore
Dr. Margherita Annicchiarico-Petruzzelli, assistente biologa
Dr. Maria Valeria Catani, assistente biologa
Dr. Alessandro Terrinoni, assistente biologo

Descrizione generale del laboratorio, della tematica di ricerca e delle collaborazioni nazionali ed internazionali

Il laboratorio di Biochimica, diretto dal Prof. Gennaro Melino, ha sede presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche dell'Università di Roma "Tor Vergata". Il laboratorio segue due linee di ricerca:

(1) Studi sul processo di differenziamento dell'epidermide e sulle basi molecolari e meccanismi patogenetici di malattie della cheratinizzazione. In questo settore di ricerca vengono studiati i difetti nell'espressione di alcuni geni relativi al differenziamento epidermico, soprattutto le mutazioni all'interno della sequenza codificante di proteine strutturali ed enzimi specifici dell'epidermide, come le cheratine e le transglutaminasi. Inoltre viene posta l'attenzione sul ruolo del fattore di trascrizione p63 della famiglia di p53 (vedi in seguito) in relazione al differenziamento epidermico ed alle displasie ectodermiche causate da mutazioni nella sua sequenza codificante. In particolare i nostri studi si sono concentrati sull'identificazione e caratterizzazione di geni trascrizionalmente regolati da p63 (sia geni codificanti proteine sia microRNA). Nell'ambito dello studio sul processo di differenziamento dell'epidermide e sulle basi molecolari e meccanismi patogenetici di malattie della cheratinizzazione, si attua sia una tipologia di ricerca di base, che coinvolge lo studio delle basi biochimiche e l'eziopatogenesi di alcune malattie di rilevanza biologica, che l'applicazione di queste conoscenze in un ambito più prettamente clinico che ricade direttamente sui pazienti. Infatti questi studi danno la possibilità di costruire test specifici di diagnostica molecolare che consentono di formulare diagnosi specifiche già in età perinatale, consentendo di conoscere il possibile evolversi della malattia e di consentire quindi un'adeguata prognosi e terapia a lungo termine.

(2) l'identificazione dei meccanismi molecolari che regolano la morte ed il differenziamento cellulare nell'epidermide e la caratterizzazione funzionale di nuovi geni coinvolti nel processo apoptotico, che possano anche funzionare da target per agenti chemioterapici. In relazione a questa seconda linea di ricerca vengono studiati i geni che regolano l'equilibrio tra proliferazione e differenziamento cellulare, tra i quali quelli della famiglia di p53. Il gene oncosoppressore p53 è un fattore trascrizionale che regola l'espressione di diversi geni coinvolti nei meccanismi di trasduzione dei segnali apoptotici (danno al DNA, ipossia). Gli altri due omologhi strutturali e funzionali di p53, denominati p63 e p73 sono espressi nelle cellule umane in differenti isoforme al 3' (α , β , γ , δ), prodotte da meccanismi di "splicing" alternativo, ed al 5' dovuti all'esistenza di due promotori (isoforme TA e Δ N). Tuttavia, p73 e p63 rispondono anche a stimoli diversi da quelli che inducono p53 e pertanto, svolgono un ruolo funzionale distinto da p53. Nell'ambito di questa ricerca abbiamo studiato la relazione tra danno al DNA e attivazione delle funzioni apoptotiche di p73 TA e Δ N. In particolar modo abbiamo studiato la regolazione della stabilità di queste proteine, dovute al targeting al proteasoma mediato da ubiquitina ligasi. Inoltre viene valutata la risposta a chemioterapici genotossici. Questi studi vengono utilizzati per lo studio di nuove molecole in grado di regolare la stabilità di p63/p73 e quindi modulare la risposta a chemioterapici in cellule tumorali. In relazione agli studi che hanno come scopo la caratterizzazione dei circuiti in grado di attivare le funzioni apoptotiche di p73, il nostro gruppo ha focalizzato la sua attenzione sullo studio di molecole in grado di regolare la stabilità di p63/p73. Abbiamo dimostrato che l'inibizione dell'espressione di Itch, una E3 ubiquitina ligasi responsabile della degradazione proteica di p63/p73, è in grado di aumentare l'effetto citotossico di vari agenti chemioterapici in diverse linee tumorali. Quindi, in linea di principio, inibitori chimici di Itch potrebbero cooperare nell'induzione di morte cellulare in tumori umani in cui p53 non è funzionale.

Collaborazioni

Collaborazioni Nazionali ed Internazionali:

- Malattie genetiche dell'epidermide (RC 1.17, RF06-CONV 73.2, ISS.526/d5.1) con il Prof Irwin McLean, Epithelial Genetics Unit, Ninewells Hospital, university of Dundee, Scotland UK
- Differenziamento epidermico in relazione alla genetica e biologia di p63 (RC1,17, FP6 –EU-EPISTEM): Prof Daniel Aberdam, INSERM Nice, France; Prof Jhon McGrath, Genetic Skin Disease Group, St John's Institute of Dermatology, St Thomas' Hospital, London, UK ; Dott.sa Eleonora Candi, Università Tor Vergata Roma
- Biologia di p73 e suoi regolatori in relazione alla resistenza a chemioterapici (RC 3.17): prof Pierluigi Nicotera, e Prof Richard Knight presso MRC Toxicology Unit, Leicester, UK; Prof Vincenzo De laurenzi, Univ Tor Vergata Roma.
- Regolazione di p63/p73 dopo danno al DNA mediato da ubiquitine-ligasi: (ACC12) Prof Pier Giuseppe Pelicci, e [dott.sa](#) Anna Lanfrancone, IEO Milano; (RC 3.17) Prof Michele Pagano, New York School of medicine, NY USA.
- Dott.sa Francesca Bernassola, Università Tor Vergata, Dip. Medicina Sperimentale, Via Montpellier,1 Roma.
- Prof Pier Giuseppe Pelicci, Dip. di Oncologia Sperimentale, IEO- Istituto Europeo di Oncologia, 20139 Milano.
- Dott.sa Anna Lanfrancone, Dip. di Oncologia Sperimentale, IEO- Istituto Europeo di Oncologia, 20139 Milano.
- Prof Michele Pagano, Department of Pathology, NYU Cancer Institute, New York University School of Medicine, 550 First Avenue, MSB 599, New York, New York 10016, USA.
- Prof Giovanni Porta, Dipartimento di Scienze cliniche, Università dell'Insubria, Via Dunant,5 Varese.
- Prof Gerald M. Cohen, MRC Toxicology Unit, University of Leicester, Lancaster Road, Leicester, UK
- Dott Paolo Salomoni, MRC Toxicology Unit, University of Leicester, Lancaster Road, Leicester, UK.
- Prof Hans van Bokhoven, Department of Human Genetics, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Nijmegen, Netherlands
- Prof. Peter Vandenabeele, Department for Molecular Biomedical Research, Univ. of Ghent UGent-VIB Research Building FSVM, Technologiepark 927, 9052 GENT, Belgium.
- Prof Tak W MAk, Director, Advanced Medical Discovery Institute, Princess Margaret Hospital, Toronto, Ontario, Canada M5G 2C1
- Dott. Volker Doetsch, Centre for Biomolecular Magnetic Resonance, Institute for Biophysical Chemistry, University of Frankfurt/Main, Germany.
- Prof. Peter Krammer, Division of Immunogenetics, Tumorimmunology Program, Im Neuenheimer Feld, Heidelberg, Germany.
- Prof. Guido Kroemer, INSERM U848, Institut Gustave Roussy, PR1, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France.
- Dott.. Giovanni Blandino, Dipartimento di Oncologia Sperimentale Istituto Nazionale Tumori Regina Elena IRCCS – Roma
- Dott. Roberto Mantovani, Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano, Italy.
- Prof Giacinto Bagetta, Department of Pharmacobiology and University Center for the Study of Adaptive Disorder and Headache (UCADH), Section of Neuropharmacology of Normal and Pathological Neuronal Plasticity, University of Calabria, Rende (CS), Italy
- Prof. Carlo Croce, Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics and Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA
- Prof.sa Corasaniti Tiziana, Dipartimento di Farmacobiologia, Università della Calabria, via P. Bucci, Ed. Polifunzionale, 87036 Rende (CS).
- Prof. Moche Oren, Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel.
- Dr Pembo Zhou, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Medical College and Graduate School of Medical Sciences of Cornell University, 1300 York Avenue, New York, NY 10021, USA
- Prof Vincenzo De laurenzi, Università di Chieti Facoltà di Medicina e Chirurgia, Dipartimento di Scienze Biomediche.

Linee di Ricerca Corrente (2010-2011)

Il laboratorio di Biochimica è coinvolto nei progetti di ricerca corrente sulle Malattie Rare di Rilevanza Dermatologica, la linea riguardante Il differenziamento terminale dell'epidermide: meccanismi molecolari e malattie genetiche correlate (1.1) e quella sui Meccanismi genetici e molecolari che regolano lo sviluppo della cute in condizioni normali e patologiche (1.3).

Le due linee 1.1 ed 1.3, sono focalizzate su patologie che interessano principalmente la cute, che riveste un'importanza notevole sulla biologia degli individui viventi in generale, e soprattutto nell'uomo. Infatti, l'epidermide è un epitelio pluristratificato la cui funzione principale è di formare una barriera protettiva bidirezionale tra l'organismo e l'ambiente esterno. A questo scopo, i maggiori costituenti cellulari dell'epidermide, i cheratinociti, vanno incontro negli strati soprabasali ad un processo progressivo di differenziamento, che culmina con la trasformazione dei cheratinociti in corneociti che formano lo strato corneo.

Inoltre, il processo che porta alla formazione dei corneociti, è oggi considerato come una forma particolare

di morte cellulare programmata o apoptosi, caratteristica della sola epidermide. Nell'epidermide, infatti, si osservano due tipi di morte cellulare a carico di compartimenti diversi: (i) l'apoptosi di singole cellule nello strato basale, che rappresenta un meccanismo di protezione contro danni tissutali e (ii) il processo di differenziamento terminale, o cheratinizzazione, che culmina con la morte del cheratinocita. Le analogie più rilevanti fra i due processi risiedono: (i) nell'attivazione di specifiche TGasi e (ii) nella loro regolazione trascrizionale da parte di fattori di trascrizione propri della regolazione del ciclo e della morte cellulare, da p21 ai membri della famiglia di p53 e al pathway di Notch.

Difetti genetici che coinvolgono enzimi e proteine strutturali implicati nel differenziamento dei cheratinociti e nella formazione e desquamazione dello strato corneo causano patologie che interessano principalmente la cute e che vengono anche definite malattie della cheratinizzazione (DOK-Disorders Of Keratinization). Si tratta di un vasto gruppo di patologie monogeniche rare che comprendono le varie forme di ittiosi semplici e sindromiche, le cheratodermie palmo-plantari, le eritrocheratodermie ecc. Nel corso degli ultimi 15 anni, l'attività di ricerca di numerosi laboratori, tra cui anche il nostro Istituto, ha portato alla definizione delle basi molecolari di queste patologie e alla caratterizzazione di diversi modelli animali di malattia. Queste acquisizioni hanno comportato, da un lato, una migliore comprensione della fisiopatologia del differenziamento epidermico e, dall'altro, progressi di rilievo in ambito diagnostico, ponendo le basi per il disegno di nuove strategie terapeutiche.

Inoltre, sappiamo che l'epidermide non è un tessuto uniforme, in quanto oltre ai cheratinociti di origine ectodermica, essa contiene anche cellule di origine mesenchimale e neuro-ectodermica, nonché, in seguito, linfociti. Lo sviluppo dell'epidermide non è simultaneo nelle varie regioni del corpo, infatti la differenziazione è più rapida a livello delle labbra e più lenta a livello del dorso, dell'addome e degli arti.

Difetti in questi processi danno luogo ad una serie di patologie riconosciute nel gruppo delle displasie ectodermiche (DE). Esse sono caratterizzate da difetti congeniti nello sviluppo dell'epidermide e dei suoi annessi. Tra le genodermatosi esse costituiscono il gruppo più numeroso (sono state descritte quasi 200 sindromi differenti) con forme a trasmissione autosomica dominante, recessiva o associate al cromosoma X. La loro incidenza è stimata intorno a 7 casi su 10.000 nascite. Le DE rappresentano un modello molto interessante per lo studio dello sviluppo di strutture di derivazione ectodermica. I difetti genetici alla base delle DE si manifestano con alterazioni della cute, dei capelli, delle unghie e dei denti. Lo spettro clinico delle DE comprende, inoltre, anomalie dei dotti lacrimali, dell'orecchio interno, dell'apparato urogenitale, dismorfismo facciale, malformazioni scheletriche e degli arti, ritardo di sviluppo, ecc.

Il prototipo di DE è la sindrome con ectrodattilia-displasia ectodermica-(labio) palatoschisi (sindrome EEC; OMIM 604292). Esistono una serie di sindromi EEC-simili che presentano alcune caratteristiche della malattia prototipica. In tutte queste, abbiamo dimostrato insieme ad altri laboratori, sono coinvolte mutazioni eterozigoti nel gene TP63 codificante per il fattore trascrizionale p63, un membro della famiglia di p53. Tali mutazioni sono in genere di natura "missense" localizzate nel dominio di legame al DNA di p63. La proteina mutante perde la capacità di legarsi al DNA ed agisce da dominante negativo per il tetramero con attività trascrizionale. Mutazioni in altri domini di p63 sono coinvolte in altre sindromi EEC-simili, quali l'AEC, la sindrome LMS (Limb-Mammary Syndrome; OMIM 603543), e la sindrome ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth syndrome; OMIM 103285).

Nell'ambito di queste linee di ricerca, abbiamo studiato dal punto di vista genetico un gruppo di pazienti con diagnosi di Ittiosi lamellare. Nello specifico i pazienti sono stati analizzati per la presenza di mutazioni nel gene della Transglutaminasi 1. I risultati tuttora parziali dimostrano che soltanto in una parte dei pazienti (circa il 30%) è presente la mutazione in questo gene (abstract Congresso Telethon 2011, Terrinoni et al). Inoltre riguardo allo studio del differenziamento epidermico attraverso modelli animali sono state ottenute le prime chimere del topo Knock Out per la Transglutaminasi-3, ingegnerizzato attraverso la tecnica del Gene-Trap, che ci permetterà di indagarne il ruolo nell'epidermide. Inoltre abbiamo effettuato studi su pazienti di sindrome KID, che hanno evidenziato la presenza di mutazioni nel gene codificate per la connessina 26 (CX26) già diffuse nel territorio Italiano ed Europeo, nonché di nuove mutazioni, localizzate in domini extra membrana, come la sostituzione G11E, le quali mettono in evidenza l'importanza dei domini intracellulari di tipo regolatorio (Terrinoni et al., Biochem Biophys Res Commun). Inoltre lo studio biochimico delle mutazioni, per la comprensione della fisiopatogenesi e del ruolo di queste proteine di comunicazione nel differenziamento epidermico, rivela la loro importanza nella gestione dei flussi di calcio. Infatti mutazioni diverse, che hanno un impatto diverso sulla regolazione del calcio intracellulare, come la G11E determinano un fenomeno di morte cellulare per necrosi molto accentuato, che contribuisce alla genesi di un fenotipo epidermico più grave. Questa diversità è apprezzabile anche a livello cocleare, con una sordità neurosensoriale più accentuata (Terrinoni et al., Biochem Biophys Res Commun).

Riguardo inoltre ai fenomeni di differenziamento e morte cellulare dipendenti da fattori di trascrizione, mediante l'uso di modelli animali, come il topo p63 ^{-/-}, abbiamo identificato l'High Mobility Group (HMG)

box protein 1 (HBP1), come regolatore di p63 nel differenziamento dei cheratinociti. La sua espressione infatti aumenta durante il differenziamento ed esperimenti di immuno-precipitazione della cromatina (ChIP) ed RNA interference dimostrano che esso interagisce con p63 inibendone l'espressione (Borrelli et al., Cell Death Differ). Negli studi sui fattori di trascrizione importanti nel differenziamento epidermico, siamo riusciti a dimostrare che l'inibitore di ASPP2 (iASPP), attraverso il controllo su p63 riesce a controllare la stratificazione dell'epitelio, con importanti implicazioni sul fenomeno dell'invecchiamento cutaneo (Notari et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2011).

Riguardo al ruolo svolto da p63 nella genesi delle displasie ectodermiche EEC-simili e nell'ambito del meccanismo di differenziamento epidermico sia i modelli in cui p63 funziona da regolatore, sia modelli in cui esso è a sua volta regolato. Per gli ultimi, sappiamo che la E3 ligasi Itch è responsabile della regolazione post traduzionale di p63, regolandone la degradazione mediata dal proteasoma. Il nostro lavoro è stato focalizzato nell'individuazione dei domini di interazione tra queste due proteine, utilizzando mutanti di p63, come I549T, riscontrati in alcune sindromi EEC-simili causate da mutazioni in p63. I risultati dimostrano che Itch e p63 interagiscono attraverso i loro motivi WW2 (Itch) e PPXY (p63) (Bellomaria et al., Cell Cycle). Sempre nell'ambito della regolazione post-traduzionale, abbiamo dimostrato che anche la E3 ligasi WWP1 è in grado di degradare DeltaNp63 attraverso la formazione di una catena di poli-ubiquitinazione del residuo di lisina 63 di DeltaNp63 (Peschiaroli et al., Biochem Biophys Res Commun). Inoltre, il ruolo fisiologico di p63 nel differenziamento dei cheratinociti è stato indagato mediante lo studio degli effetti di alcuni importanti fattori, come Skn-1a/Oct-11, appartenente ai fattori di trascrizione della famiglia POU. Abbiamo inoltre dimostrato che quest'ultimo ha un effetto antagonista rispetto a quello di DeltaNp63 e che i due fattori sono in grado di interagire fisicamente, in quanto i mutanti di p63 non reagiscono al controllo di Skn-1a (Lena et al., Biochem Biophys Res Commun). Utilizzando tessuti prelevati da embrioni murini selvatici e dal modello p63^{-/-}, disponibile in laboratorio, abbiamo identificato un gruppo di geni che viene attivato durante la prima fase di stratificazione dei cheratinociti e un gruppo di geni specifici del mesoderma, che vengono al contrario disattivati. Nel topo questo processo si verifica durante il giorno 11.5 dell'embriogenesi (Shalom-Feuerstein et al., Cell Death Differ, 2011). Inoltre, sempre nel quadro dello studio dei target di p63, abbiamo identificato FGFR3 come nuovo gene bersaglio di p63; mutazioni nella sequenza codificante quest'ultimo sono collegate anche a condizioni cliniche dermatologiche, probabilmente dovute alla riduzione del cross-talk tra fibroblasti e cheratinociti, normalmente mediata da FGFR3 (Sayan et al., Biochem Biophys Res Commun). L'analisi molecolare del gene che codifica per p63, in un paziente affetto da Rapp-Hodgkin/AEC/ADULT, ha dimostrato la presenza di una mutazione che coinvolge il dominio trans-inibitorio di p63 (TID), che provoca una generale "gain of function" della proteina rispetto alle mutazioni "loss" del dominio di legame con il DNA (Serra et al., Am J Med Genet A, 2011).

Il laboratorio di Biochimica è anche coinvolto nella linea di Oncologia Dermatologica, con il progetto In relazione a questo progetto, incentrato sullo studio del coinvolgimento dei membri della famiglia di p53, nella cancerogenesi e nella gestione del ciclo cellulare ed apoptosi, abbiamo analizzato le mutazioni di p53, soffermandoci in particolare sull'effetto di queste come dominante negativo verso gli altri membri della famiglia, quali p63 e p73. Abbiamo dimostrato che tali mutazioni determinano una funzione anti apoptotica inibendo l'azione di p63 e p73 e dando come risultato finale l'inibizione della morte cellulare in seguito al danno al DNA (Schilling et al., Biochem Biophys Res Commun). L'importanza di questo effetto, da noi dimostrato, è confermata poiché in seguito all'evento apoptotico indotto da chemioterapici, si verifica l'induzione sia di TAp63 che di TAp73, attivando così sia la via intrinseca che la via estrinseca di apoptosi (Seitz et al., Int J Cancer). Il ruolo di p73, svolto nella via di risposta al danno al DNA, è stato confermato anche mediante l'uso di modelli animali p73^{-/-} (Wilhelm et al., Genes Dev). Il meccanismo d'azione di p63 e p73 deve tener conto del ruolo svolto dalle singole isoforme, spesso in opposizione tra loro. Infatti i nostri dati dimostrano che l'isoforma DeltaNp73 ha un potere oncogenico nel carcinoma epatocellulare poiché riesce a bloccare l'apoptosi indotta dai recettori di morte attraverso la via mitocondriale (Schuster et al., Cell Cycle). Anche DeltaNp63 induce specificamente resistenza al trattamento con chemioterapici nell'epatocarcinoma, inibendo la via apoptotica (Mundt et al., Biochem Biophys Res Commun). Una possibile via di azione su questi fattori di trascrizione potrebbe essere quella di agire sulle E3 ligasi che ne controllano la degradazione post traduzionale attraverso la via del proteasoma, abbiamo dimostrato che la ligasi PIR2 è in grado di degradare differenzialmente le isoforme di p73, incrementando il rapporto TAp73/DeltaNp73 (Sayan et al., Proc Natl Acad Sci U S A). Inoltre il rapporto TAp73/DeltaNp73 può essere modificato mediante l'azione di c-jun, attraverso un meccanismo di stabilizzazione dell'isoforma TA e la degradazione specifica di DeltaNp73 attraverso la via non-classica indotta da poliammine (Dulloo et al., Proc Natl Acad Sci U S A), indipendente dalle E3 ligasi, ma comunque sempre attraverso il proteasoma. p73 inoltre ha un ruolo centrale nella sopravvivenza dei linfociti T attivati attraverso la via per cui NF-

kappaB induce l'aumento di MDM2. Infatti il legame di quest'ultimo con p73 ne inibisce il segnale apoptotico e determina la sopravvivenza dei linfociti (Busuttill et al., Proc Natl Acad Sci U S A). In lavori precedenti avevamo dimostrato che p73 interagisce con la proteina nucleare FLASH ed il complesso p73 e FLASH si localizza in alcuni corpuscoli nucleari chiamati corpi di Cajal. Flash costituisce insieme anche ad NPAT gli Histone Locus Bodies, abbiamo dimostrato che la distruzione di questi complessi attraverso radiazione UVC, che degrada sia Flash che NPAT risulta nell'arresto delle cellule nella fase G2, in quanto viene inibita la replicazione dipendente dalla trascrizione dei geni istonici (Bongiorno-Borbone et al., Oncogene). Infine continuando gli studi su p73 in modelli animali, abbiamo chiarito quest'ultimo è espresso nelle cellule staminali neurali, e che la sua espressione aumenta durante il differenziamento delle cellule nervose, infatti le cellule nervose dei topi p73^{-/-} hanno una ridotta capacità proliferativa se esaminata per l'espressione di marker specifici come SOX2 e geni della famiglia di Notch, inoltre in vivo gli animali presentano delle aree neogeniche, fatto questo dovuto prevalentemente all'assenza dell'isoforma TA, mentre la DeltaN è correlata a deregolazione del ciclo cellulare come nel neuroblastoma (Agostini et al., Biochem Biophys Res Commun). Nel neuroblastoma abbiamo anche investigato il ruolo di alcuni micro RNA (miR), dimostrando che i MiR7 e miR-214 sono molto importanti nel controllo del ciclo cellulare delle cellule nervose e sono differenzialmente espressi nello stato patologico di neuroblastoma (Chen et al., Biochem Biophys Res Commun). Analisi su altri tipi di tumori come il carcinoma duttale mammario hanno anche dimostrato l'importanza di alcuni geni omeobox come OTX1, che risulta overespresso nelle situazioni patologiche (Pagani et al., Breast J). OTX1 risulta essere importante come gene oncosoppressore, in quanto abbiamo dimostrato che esso viene espresso sotto l'azione di p53 in cellule di carcinoma mammario duttale, l'espressione di OTX determina la riattivazione del pathway di differenziamento di queste cellule e risulta in un effetto citostatico (Terrinoni et al., Oncogene, 2011). Inoltre gli studi che abbiamo effettuato sull'efficienza del sistema di riparo del mismatch (MMR), indicano una correlazione positiva con l'insorgenza del cancro al colon-retto (Vernole et al., Mutat Res, 2011), ed inoltre abbiamo anche dimostrato che anche l'influenza di alcuni microRNA è importante nel controllo della proliferazione neoplastica, infatti i nostri studi su tumori epiteliali prostatici dimostrano che il miR-203 controlla proprio la transizione epitelio-mesenchimale (Viticchie et al., Cell Cycle, 2011)

References

- Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G (2010) p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 403:13-17.
- Bellomaria A, Barbato G, Melino G, Paci M, Melino S (2010) Recognition of p63 by the E3 ligase ITCH: Effect of an ectodermal dysplasia mutant. *Cell Cycle* 9:3730-3739.
- Bongiorno-Borbone L, De Cola A, Barcaroli D, Knight RA, Di Ilio C, Melino G, De Laurenzi V (2010) FLASH degradation in response to UV-C results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest. *Oncogene* 29:802-810.
- Borrelli S, Candi E, Hu B, Dolfini D, Ravo M, Grober OM, Weisz A, Dotto GP, Melino G, Vigano MA, Mantovani R (2010) The p63 target HBP1 is required for skin differentiation and stratification. *Cell Death Differ* 17:1896-1907.
- Busuttill V, Droin N, McCormick L, Bernassola F, Candi E, Melino G, Green DR (2010) NF-kappaB inhibits T-cell activation-induced, p73-dependent cell death by induction of MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18061-18066.
- Chen H, Shalom-Feuerstein R, Riley J, Zhang SD, Tucci P, Agostini M, Aberdam D, Knight RA, Genchi G, Nicotera P, Melino G, Vasa-Nicotera M (2010) miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 394:921-927.
- Dulloo I, Gopalan G, Melino G, Sabapathy K (2010) The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4902-4907.

Lena AM, Cipollone R, Amelio I, Catani MV, Ramadan S, Browne G, Melino G, Candi E (2010) Skn-1a/Oct-11 and DeltaNp63alpha exert antagonizing effects on human keratin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 401:568-573.

Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M (2010) Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 396:335-341.

Notari M, Hu Y, Koch S, Lu M, Ratnayaka I, Zhong S, Baer C, Pagotto A, Goldin R, Salter V, Candi E, Melino G, Lu X (2011) Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16645-16650.

Oh K, Park HB, Byoun OJ, Shin DM, Jeong EM, Kim YW, Kim YS, Melino G, Kim IG, Lee DS (2011) Epithelial transglutaminase 2 is needed for T cell interleukin-17 production and subsequent pulmonary inflammation and fibrosis in bleomycin-treated mice. *J Exp Med* 208:1707-1719.

Pagani IS, Terrinoni A, Marengi L, Zucchi I, Chiaravalli AM, Serra V, Rovera F, Sirchia S, Dionigi G, Mozzo M, Frattini A, Ferrari A, Capella C, Pasquali F, Curto FL, Albertini A, Melino G, Porta G (2010) The mammary gland and the homeobox gene Otx1. *Breast J* 16 Suppl 1:S53-56.

Peschiarioli A, Scialpi F, Bernassola F, El Sherbini el S, Melino G (2010) The E3 ubiquitin ligase WWP1 regulates DeltaNp63-dependent transcription through Lys63 linkages. *Biochem Biophys Res Commun* 402:425-430.

Popov Y, Sverdlov DY, Sharma AK, Bhaskar KR, Li S, Freitag TL, Lee J, Dieterich W, Melino G, Schuppan D (2011) Tissue transglutaminase does not affect fibrotic matrix stability or regression of liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 140:1642-1652.

Rouleau M, Medawar A, Hamon L, Shvitiel S, Wolchinsky Z, Zhou H, De Rosa L, Candi E, de la Forest Divonne S, Mikkola ML, van Bokhoven H, Missero C, Melino G, Puceat M, Aberdam D (2011) TAp63 Is Important for Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells and Heart Development. *Stem Cells* 29:1672-1683.

Rufini S, Lena AM, Cadot B, Mele S, Amelio I, Terrinoni A, Desideri A, Melino G, Candi E (2011) The sterile alpha-motif (SAM) domain of p63 binds in vitro monoasialoganglioside (GM1) micelles. *Biochem Pharmacol* 82:1262-1268.

Salah Z, Melino G, Aqeilan RI (2011) Negative regulation of the Hippo pathway by E3 ubiquitin ligase ITCH is sufficient to promote tumorigenicity. *Cancer Res* 71:2010-2020.

Sayan AE, D'Angelo B, Sayan BS, Tucci P, Cimini A, Ceru MP, Knight RA, Melino G (2010a) p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3. *Biochem Biophys Res Commun* 394:824-828.

Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Tucci P, Piro MC, Browne GJ, Agostini M, Bernardini S, Knight RA, Mak TW, Melino G (2010b) Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12877-12882.

Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, Muller M (2010) Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 394:817-823.

Schuster A, Schilling T, De Laurenzi V, Koch AF, Seitz S, Staib F, Teufel A, Thorgeirsson SS, Galle PR, Melino G, Stremmel W, Krammer PH, Muller M (2010) DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle* 9.

Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M (2010) Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer* 126:2049-2066.

Serra V, Castori M, Paradisi M, Bui L, Melino G, Terrinoni A (2011) Functional characterization of a novel TP63 mutation in a family with overlapping features of Rapp-Hodgkin/AEC/ADULT syndromes. *Am J Med Genet A*.

Shalom-Feuerstein R, Lena AM, Zhou H, De La Forest Divonne S, Van Bokhoven H, Candi E, Melino G, Aberdam D (2011) DeltaNp63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis. *Cell Death Differ* 18:887-896.

Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Bruno E, Didona B, Paradisi M, Nistico S, Campione E, Napolitano B, Diluvio L, Melino G (2010a) Connexin 26 (GJB2) mutations as a cause of the KID syndrome with hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 395:25-30.

Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Didona B, Bruno E, Nistico R, Giustizieri M, Alessandrini M, Campione E, Melino G (2010b) Connexin 26 (GJB2) mutations, causing KID Syndrome, are associated with cell death due to calcium gating deregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 394:909-914.

Terrinoni A, Pagani IS, Zucchi I, Chiaravalli AM, Serra V, Rovera F, Sirchia S, Dionigi G, Miozzo M, Frattini A, Ferrari A, Capella C, Pasquali F, Curto FL, Albertini A, Melino G, Porta G (2011) OTX1 expression in breast cancer is regulated by p53. *Oncogene* 30:3096-3103.

Vernole P, Muzi A, Volpi A, Terrinoni A, Dorio AS, Tentori L, Shah GM, Graziani G (2011) Common fragile sites in colon cancer cell lines: role of mismatch repair, RAD51 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mutat Res* 712:40-48.

Viticchie G, Lena AM, Latina A, Formosa A, Gregersen LH, Lund AH, Bernardini S, Mauriello A, Miano R, Spagnoli LG, Knight RA, Candi E, Melino G (2011) MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle* 10:1121-1131.

Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, Itie-Youten A, Wakeham A, Arsenian-Henriksson M, Melino G, Kaplan DR, Miller FD, Mak TW (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev* 24:549-560.

Alleanza Contro il Cancro (ACC) Programma 3: Trasferimento delle conoscenze allo sviluppo di interventi volti a prevenire, diagnosticare e trattare il cancro.

Progetto: "Nuove molecole e peptidi quali farmaci regolatori del ciclo cellulare e della risposta a chemioterapici nei tumori epiteliali e cutanei": ACC12

Responsabile: Prof Gerry Melino

UO-1, IDI-IRCCS, Laboratorio di Biochimica, Prof Melino.

UO-2, IFO, Dott. Giovanni Blandino

UO-3, ID-IRCCS, Dott.sa Stefania D'Atri

I membri della famiglia genica di p53, p63, p73 e lo stesso p53, regolano diversi processi biologici, come la progressione del ciclo cellulare, senescenza e apoptosi. Analogamente a p53, p63 e p73 sono coinvolti nello sviluppo di neoplasie e diversi tumori umani, in particolare i tumori epiteliali, mostrano deregolazione dell'espressione di p63 e p73. Mentre p53 è degradato dalla E3 ubiquitina ligasi Mdm2, la degradazione proteica di p63/p73 è regolata da Itch, una E3 ubiquitina ligasi contenente HECT ed appartenente alla famiglia di Nedd4. Oltre a p63/p73, Itch reprime la via di Hedgehog e dei suoi trasduttori (proteine Gli), la cui attivazione è frequentemente responsabile dell'insorgenza di tumori neuroectodermici. Inoltre, l'inibizione dell'espressione di Itch aumenta l'effetto citotossico di diversi agenti chemioterapici in linee tumorali umane. Itch rappresenta quindi un candidato ideale per la terapia oncologica, ed inibitori chimici di questa E3 ubiquitina ligasi potrebbero rappresentare una terapia innovativa nella modulazione della risposta apoptotica. Oltre ad usare Itch come target farmacologico diretto, è possibile ipotizzare un'azione sinergica con altre molecole che regolano punti diversi della stessa via: cicline-chinasi dipendenti (CDK) e regolatori di IKK/NF- κ B. Nelle cellule tumorali si riscontra quasi costantemente un'aumentata attività delle CDKs e una modulazione negativa della loro attività/espressione può determinare inibizione della crescita tumorale in vitro ed in modelli animali. Analogamente, la proteina-chinasi B-Raf (RaLP) regola proliferazione e sopravvivenza cellulare, promuovendo la tumorigenesi, e IKK/NF- κ B è costitutivamente attivata nei tumori, dove NF- κ B causa resistenza all'apoptosi da farmaci antitumorali. L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare nuove molecole inibitori della E3-ubiquitina-ligasi Itch e di validare tali molecole nella via p63/p73 e nella via Hedgehog/Gli. Inoltre, valuteremo il potenziale terapeutico di peptidi capaci di disassemblare complessi proteici (p53/p73) ad attività oncogenica, e studieremo il

potenziale terapeutico di inibitori selettivi di NF- κ B/IKK e di CDKs, come singoli agenti ed in associazione con gli inibitori di Itch e chemioterapici convenzionali. Analizzeremo l'espressione della proteina chinasica RaLP nei melanomi e caratterizzeremo la trasduzione del segnale da essa attivata. I risultati ottenuti da questi studi permetteranno l'identificazione di nuovi bersagli molecolari (Itch) su nuove vie (p63/p73/Hedgehog/Gli) con nuove specifiche molecole (da noi identificate) ad attività anti-tumorale. La valutazione anche in modelli animali del sinergismo (CDK2/B-Raf/IKK/NF- κ B) di queste nuove molecole contribuirà al miglioramento delle terapie chemioterapiche classiche nei tumori epiteliali oggi resistenti ai farmaci.

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

L'Unità Operativa U.O.1 ha esteso ed approfondito i suoi studi sull'attività dei fattori di trascrizione p63 e p73 e sul loro ruolo in processi fisiologici (differenziamento neuronale ed epiteliale) e in processi patologici (neoplasie epiteliali). In dettaglio, abbiamo dimostrato che in assenza dell'attività di NF- κ B la regolazione dell'espressione genica del fattore pro-apoptotico Bim-EL è mediata da TAp73. Tale meccanismo è fondamentale nella regolazione della morte cellulare sia in linfociti primari sia in linee di linfomi umani. Inoltre, abbiamo dimostrato che p73 e p63 sono in grado di regolare l'espressione di FGF3, un membro della famiglia dei recettori del fattore di crescita FGF, la cui azione biologica è importante sia nello sviluppo di processi neoplastici che in alcune patologie a carico del tessuto muscolare. Per quanto riguarda i meccanismi regolativi dell'espressione dei geni della famiglia di p53 abbiamo identificato una nuova E3 ubiquitina ligasi capace di legare, ubiquitinare e regolare la degradazione proteica dell'isoforma oncogenica di p73, DNP73, ma non dell'isoforma TAP73. Tale meccanismo di degradazione selettiva regola la risposta apoptotica indotta da diversi agenti chemioterapici in cellule tumorali. Per quanto riguarda l'identificazione di nuove vie potenzialmente importanti nel modulare la risposta apoptotica indotta da trattamenti chemioterapici, abbiamo dimostrato che inibitori delle deacetilasi istoniche, in particolare TSA e LBH589, inducono l'espressione di TAp63 in alcune linee di cellule tumorali, favorendo quindi la risposta apoptotica mediata da questi inibitori. L'Unità Operativa U.O.2 ha focalizzato i suoi studi su piccole molecole peptidiche chiamate SIMP (Short-interfering mutant p53 peptides), la cui sequenza amminoacidica ricapitola la maggior parte della sequenza del dominio di legame al DNA della proteina p73. Tali peptidi sono in grado di disassemblare i complessi proteici oncogenici m-p53/p73 presenti in cellule tumorali a p53 mutata. In particolare il peptide SIMP1 è in grado di rompere i complessi m-p53/p73 in cellule tumorali portatrici della mutazione p53His-273. Il trapianto in topi nudi di cellule tumorali trasdotte con i peptidi SIMP1 e SIMP1M evidenziava una drastica riduzione del calibro dei tumori rispetto ai gruppi di controllo SIMP1KO o SIMP5M. Riguardo alla caratterizzazione del ruolo di RaLP nella differenziamento e nello sviluppo, abbiamo creato un modello murino RaLP knockout (KO). Dati iniziali sulle cellule staminali neurali (NSCs) adulte derivate da questi topi hanno suggerito che, in queste cellule, RaLP è coinvolto nella differenziazione precoce oppure nella determinazione del destino cellulare (commitment), ma non nella maturazione di neuroni. Abbiamo, dunque, analizzato la differenziazione delle cellule staminali embrionali (ES) derivate dai topi RaLP KO o eterozigoti in NSC. Abbiamo trovato che RaLP è sovraespresso durante le prime fasi della differenziazione delle cellule ES, quando l'ectoderma (dal quale derivano le NSCs) viene formato. Inoltre, Sox1, un importante fattore nella specificazione e nel mantenimento del neuroectoderma, non è sovraespresso nelle cellule ES KO. Questi dati indicano che RaLP gioca un ruolo specifico nella formazione del neuroectoderma. Il gruppo coordinato dalla Prof.ssa Santoro ha dimostrato che in cellule di melanoma chemioresistenti i prostanoidi ciclopentanonici (CyPG) naturali e sintetici agiscono ad un duplice livello, da una parte inibendo l'attività costitutiva del fattore NF- κ B e dall'altra causando l'attivazione prolungata (fino a 24 ore) della chinasi JNK1. È stato dimostrato un ruolo chiave della proteina XIAP nel controllo della sopravvivenza di cellule di melanoma. In seguito all'esposizione ai CyPG è stata infatti osservata una rapida deplezione di XIAP seguita dall'attivazione del processo apoptotico caspasi-dipendente, mentre la sovraespressione della proteina, si è rivelata in grado di contrastare l'attività pro-apoptotica dei CyPG. La caratterizzazione del ruolo del fattore HSF1 nella sopravvivenza cellulare ha portato lo scorso anno alla scoperta di un nuovo gene 'heat shock' di tipo canonico, il gene AIRAP. Abbiamo ora dimostrato che i CyPG sono potenti induttori dell'espressione di AIRAP in cellule tumorali ed in cellule endoteliali umane. L'Unità Operativa 3, coordinata dalla Dott.ssa Stefania D'Atri, (IDI-IRCCS) ha caratterizzato alcuni geni (i.e. PDCD4, DDIT4, SESN2, PTTG1, BIRC5, CDC25A) la cui espressione è modulata dal trattamento con CDK2-I. Nella linea GL-Mel, l'analisi mostra una diminuzione d'espressione di PTTG1, CDC25A e survivina (codificata da BIRC5) ed un aumento d'espressione di DDIT4, PDCD4, and sestrina 2 (codificata da SESN2). Nella linea M10, l'esposizione a CDK2-I ha ugualmente indotto un aumento di DDIT4 e sestrina 2, ed una diminuzione di CDC25A, mentre non ha modificato l'espressione di PDCD4, PTTG1, e survivina, suggerendo che la modulazione di tali geni può contribuire all'attività antitumorale del CDK2-I. Gli studi successivi sono stati focalizzati sul gene PTTG1. Il prodotto proteico di

PTTG1, anche noto come securina, è coinvolto in numerosi processi biologici, quali progressione del ciclo cellulare, apoptosi, migrazione ed invasione, riparo del DNA, angiogenesi. Al fine di stabilire se la modulazione negativa di PTTG1 contribuisce agli effetti anti-proliferativi di CDK2-I, cellule della linea GL-Mel ed M10 sono state trasfettate con uno siRNA diretto verso PTTG1 (siPTTG1). I risultati ottenuti hanno dimostrato che nella linea GL-Mel, nella quale il trattamento con CDK2-I induce di per se una inibizione dell'espressione di securina già dopo 24 h, la trasfezione con siPTTG1 non modificava la sensibilità al CDK2-I. Nella linea M10, nella quale il trattamento con CDK2-I non determina una riduzione dei livelli di securina, la trasfezione con siPTTG1 aumentava di circa 2 volte la sensibilità al CDK2-I. Un'altra linea di ricerca dell' U.O. 3 è rivolta allo studio dei meccanismi attraverso i quali le proteine Numb ed Itch, governano il pathway di Gli1/Hedgehog. A tal proposito sono stati identificati i domini di interazione molecolare e funzionale di Numb ed Itch con Gli1, dimostrando che le tre proteine formano un complesso. Numb ha il ruolo di attivare Itch, liberandolo da una conformazione autoinibitoria. Questo processo è mediato da una nuova degron, Itch-dependent, costituita da una combinazione di due PPXY ed un motivo pSP. Lo screening, attualmente in corso, di molecole naturali recentemente isolate, consentirà di identificare nuovi composti in grado di modulare l'attività di questi due importanti regolatori del signaling di Hedgehog, Numb ed Itch. Inoltre, la caratterizzazione del meccanismo di inibizione di Gli1 mediato da REN, ha portato ad identificare REN come una nuova Cul3 E3 ligasi, che mediando l'ubiquitinazione e degradazione della deacetilasi HDAC1, inibisce il signaling di Hedgehog e lo sviluppo di medulloblastoma.

Il laboratorio di Biochimica, partecipa anche al progetto ACC:

Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche).

Unità Operativa 1 Direttore Prof. Piergiuseppe Pelicci

Gruppo di Ricerca 8 IDI-IRCCS, Dott Alessandro Terrinoni

Durante questo secondo anno di finanziamento abbiamo studiato gli effetti dell'inibitore delle de-acetilasi istoniche (HDAC) sui livelli di Itch e p73 nelle leucemie linfocitiche croniche (CLL). Abbiamo analizzato i livelli di espressione di Itch e di p73 in circa 12 tumori primari trattati con l'inibitore HDAC LBH589. Abbiamo dimostrato che in seguito all'apoptosi indotta dal LBH589, Itch è processato da caspasi 3 nel residuo Asp242 eliminando una porzione inibitoria della sua attività catalitica (1). Inoltre abbiamo dimostrato che né il mir-106b né il mir-34a hanno come target Itch in questi tipi di tumore (2), come precedentemente dimostrato da altri gruppi. Per quanto riguarda la degradazione ubiquitina-dipendente di p73, abbiamo identificato un secondo meccanismo che coinvolge l'E3 ubiquitina ligasi SCFFBXO45. Abbiamo dimostrato che la proteina F-box FBXO45 lega, ubiquitina e controlla la stabilità proteica di p73 in vivo. Inoltre, il silenziamento di FBXO45 induce morte cellulare in maniera p53-indipendente (3). Per quanto riguarda l'identificazione di nuove vie potenzialmente importanti nel modulare la risposta apoptotica indotta da trattamenti chemioterapici, abbiamo dimostrato che l'enzima de-ubiquitinasi USP47 è un nuovo interattore del complesso SCFTrcp la cui deplezione sensibilizza diverse linee tumorali all'apoptosi indotta da diversi agenti genotossici (4). Furthermore we have identified a microRNA (miR-217) that is progressively expressed in endothelial cells with aging. miR-217 regulates the expression of silent information regulator 1 (SirT1), a major regulator of longevity and metabolic disorders that is progressively reduced in multiple tissues during aging (5). We also investigated on the effect of the silencing of RAD51, that increase the sensitivity of mismatch repair deficient cells to bleomycin clastogenicity (6).

Pubblicazioni

- Angelini M., Rossi A., Coccia M. and Santoro M.G. NF- κ B independent induction of COX-2 expression by 15-deoxy D12,14-prostaglandin J2 in endothelial cells: role of c-Jun N-terminal protein kinase 1. (in preparation).
- Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G. p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct 25
- Belardo G., Piva R. and Santoro M.G. Heat stress triggers apoptosis by impairing NF- κ B survival signalling in malignant B cells. *Leukemia*, 24:187-196, 2010.
- Bellomaria A, Barbato G, Melino G, Paci M, Melino S. Recognition of p63 by the E3 ligase ITCH: Effect of an ectodermal dysplasia mutant. *Cell Cycle*. 2010 Sep;9(18):3730-9.
- Bongiorno-Borbone L, De Cola A, Barcaroli D, Knight RA, Di Ilio C, Melino G, De Laurenzi V. FLASH degradation in response to UV-C results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest. *Oncogene*. 2010 Feb 11;29(6):802-10.

- Brunelli C., Amici C., Angelini M., Fracassi C. and Santoro M.G. The nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin activates the eIF2a kinase PKR, causing a translational block in human colorectal cancer cells. (submitted).
- Busuttill V, Droin N, McCormick L, Bernassola F, Candi E, Melino G, Green DR. NF-kappaB inhibits T-cell activation-induced, p73-dependent cell death by induction of MDM2.
- Canettieri G, Di Marcotullio L, Greco A, Coni S, Antonucci L, Infante P, Pietrosanti L, De Smaele E, Ferretti E, Miele E, Pelloni M, De Simone G, Pedone EM, Gallinari P, Giorgi A, Steinkühler C, Vitagliano L, Pedone C, Schinin ME, Screpanti I, Gulino A. Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nat Cell Biol.* (2010) 12, 132-142.
- Caporali S, Alvino E, Starace G, Ciomei M, Brasca MG, Levati L, Garbin A, Castiglia D, Covaciu C, Bonmassar E, and D'Atri S. The cyclin-dependent kinase inhibitor PHA-848125 suppresses the in vitro growth of melanomas sensitive or resistant to temozolomide and shows synergistic effects in combination with this triazene compound. *Pharmacol Res* 61:437-448, 2010.
- Careccia S, Mainardi S, Pelosi A, Gurtner A, Diverio D, Riccioni R, Testa U, Pelosi E, Piaggio G, Sacchi A, Lavorgna S, Lo-Coco F, Blandino G, Levrero M, Rizzo MG. A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene.* 2009 Nov 12;28(45):4034-40.
- Ciuffini L., Belardo G., Angelini M. and Santoro M.G. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 triggers apoptosis in human melanoma cells by impairing NF-kB survival signaling: role of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. (in preparation).
- De Cola A., Bongiorno-Borbone L., Bianchi E., Barcaroli D., Knight R.A., Di Ilio C., Melino G. Sette C. and De Laurenzi V. FLASH is essential during early embryogenesis and cooperates with p73 to regulate histone gene transcription. Submitted
- Di Agostino S, Dell'Orso S, Cortese G, Eisenstein M, Citro G, Strano S, Blandino G. SIMP1 impairs in vivo tumor growth and response to anticancer agents of mutant p53 tumors. Manuscript in preparation.
- Di Marcotullio L, Greco A, Mazzà D, Canettieri G, Pietrosanti L, Infante P, Coni S, Moretti M, De Smaele E, Ferretti E, Screpanti I and Gulino A. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene* (Sep.6, 2010).
- Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, Terrenato I, Mottolese M, Muti P, Domany E, Del Bufalo D, Strano S, Blandino G. The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Oct;16(10):1086-93.
- Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res.* (2010) 316, 900-906.
- Lena AM, Cipollone R, Amelio I, Catani MV, Ramadan S, Browne G, Melino G, Candi E. Skn-1a/Oct-11 and ΔNp63α exert antagonizing effects on human keratin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Oct 29;401(4):568-73.
- Pockley A.G., Calderwood S.K. and Santoro M.G. Prokaryotic and Eukaryotic Heat Shock Proteins in Infectious Disease, Springer-Verlag New York, LLC, 2010. ISBN: 978-90-481-2975-1.
- Rossi A., Trotta E., Brandi R., Arisi I., Coccia M. and Santoro M.G. AIRAP: a new human heat shock gene regulated by Heat Shock Factor 1. *J. Biol. Chem.*, 285:13607-13615, 2010.
- Santoro M.G., Amici C. and Rossi A. Role of heat shock proteins in viral infection. In A.G. Pockley et al. (eds) Prokaryotic and Eukaryotic Heat Shock Proteins in Infectious Disease, pp. 51-84, Springer-Verlag, New York, 2010.
- Sayan AE, D'Angelo B, Sayan BS, Tucci P, Cimini A, Cerù MP, Knight RA, Melino G. p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 9;394(3):824-8. Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Bernardini S, Tucci P, Vasa-Nicotera M, Knight RA, Melino G. Induction of TAp63 by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 22;391(4):1748-51. Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Tucci P, Piro MC, Browne GJ, Agostini M, Bernardini S, Knight RA, Mak TW, Melino G. Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 20;107(29):12877-82.

RF8-RF07-57

Responsabile Scientifico Prof. Gerry Melino

Unità Operative

UO-1 Laboratorio di BiochimicaIDI-IRCCS prof Gerry Melino

UO-2 Dipartimento di Medicina Sperimentale Univ Tor Vergata, Prof Candi Eleonora

UO-3 Università della Calabria - Dipartimento Farmacobiologico, prof Antonio Luigi Morrone

Titolo: "Role of p63 in epidermal differentiation program of normal skin and in EEC-like syndromes".

L'obiettivo di questo progetto è quello di stabilire le basi molecolari, che definiscono il ruolo fisiopatologico dei mutanti di p63 nelle sindromi EEC-Simili, attraverso l'identificazione di nuove mutazioni di p63 nei pazienti, effettuato anche all'interno della linea di RC 1.3, l'identificazione dei geni trascrizionalmente

regolati da p63, comparati a quelli regolati dai mutanti, nonché lo studio della regolazione post-trascrizionale dei mutanti stessi. I risultati recenti di questa ricerca possono essere così riassunti

Studio della regolazione genica di p63 (Gene Array): p63 è un fattore trascrizionale che appartiene alla famiglia di p53, importante nello sviluppo e nell'omeostasi della cute. p53 e p63 hanno un grado elevato di omologia nel dominio di legame al DNA. Anche se i domini di interazione con il DNA di p63 interagiscono con le stesse sequenze consenso riconosciute da p53 e questi geni sono in grado di regolare molti dei geni regolati da p53, studi recenti suggeriscono che molti geni bersaglio rispondono in maniera differente ai diversi membri della famiglia. p63 risulta essere mutato in alcune sindromi da displasia ectodermica, tra cui SHFM, EEC, AEC, LMS etc. Alcuni mutanti di p63 risultano essere trascrizionalmente inattivi mentre altri, tra cui Q634X, mutazione che causa SHFM, mantengono la propria attività trascrizionale. Per identificare i geni regolati da p63 wt e dal mutante attivo Q634X, abbiamo utilizzato la tecnologia dei gene array, che permette l'analisi di un gran numero di geni differenzialmente espressi in due o più campioni di RNA. Abbiamo scelto le Saos-2 che sono state trasfettate con vettori che consentissero l'espressione di TAp63 e DNp63 wt e mutato (Q634X). Le linee cellulari utilizzate sono la linea di osteosarcoma Saos-2 (p53 negativa) in cui è già stato dimostrato che l'espressione esogena di p73 e di p63 induce arresto del ciclo cellulare ed apoptosi. Il confronto tra i geni indotti p63 wt e p63 mutato ha permesso l'identificazione di numerosi geni bersaglio selettivamente attivati da ciascuna isoforma. I dati ottenuti dall'array Affymetrix, effettuato con RNA totale estratto da cellule Saos-2 a 24 ore dalla trasfezione con vettori di espressione per TA e DN-p63a wt e portanti la mutazione Q634X, sono stati analizzati con un nuovo tipo di analisi bioinformatica (Enrichment Map Technology), che considera le possibili relazioni fra i geni target evidenziati e permette di valutare l'impatto globale della presenza delle diverse isoforme di p63 wt e mutanti sui diversi pathway cellulari (ciclo cellulare, signalling, metabolismo, sviluppo e differenziamento, trascrizione, sintesi e degradazione di proteine, trasporto ionico e così via). Grazie a questo nuovo approccio è stato possibile non solo creare una nuova lista di geni differenzialmente espressi, ma raggruppare i messaggeri a seconda della funzione svolta nella cellula dalla relativa proteina codificata. Abbiamo iniziato a validare i geni regolati (in collaborazione con UO-03).

Controllo post-traduzionale dell'attività di p63:

Abbiamo studiato come meccanismi di regolazioni post-traduzionali siano importanti per controllare funzionalmente p63. In particolare, abbiamo dimostrato che l'isoforma TAp63, espressa negli oociti, è fosforilata e stabilizzata da c-Abl dopo trattamenti che inducono danno al DNA (cis-platino, irradiazioni raggi gamma). Abbiamo identificato il sito di fosforilazione e dimostrato che il trattamento in vivo di topi con un inibitore di c-Abl blocca l'apoptosi degli oociti in seguito a danno al DNA. I livelli proteici di p63 sono controllati anche dai microRNA (miR). Abbiamo identificato che miR-203 interagendo con una sequenza di riconoscimento conservata sul 3'-UTR dell'mRNA per p63 contribuisce a regolare i livelli endogeni di p63 nei cheratinociti durante il differenziamento epidermico (in collaborazione con l'UO-02).

Modelli murini per lo studio delle malattie EEC-simili

il nostro progetto di ricerca prevede l'uso di modelli murini, per studiare l'espressione di p63 nelle varie fasi del differenziamento e sviluppo. Avevamo precedentemente creato modelli murini p63^{-/-} e topi transgenici per le due isoforme di p63 (TAp63; DeltaNp63) sotto il promotore della cheratina 5, specificamente espresso nello strato basale dell'epidermide. Allo scopo di generare modelli murini che esprimessero il fattore di trascrizione in maniera inducibile abbiamo utilizzato il sistema Tet-On che consente di esprimere il transgene solo quando si aggiunge tetraciclina per via sistemica o nell'acqua da bere. Inoltre, l'induttore può essere posto sotto il controllo di un promotore ubiquitario (CMV), oppure tessuto specifico (K14, K18). Abbiamo costruito un vettore di espressione contenente le isoforme TAp63 e DeltaNp63, sia selvatica che mutante. Come mutanti sono stati scelti il T533P e Q634X, associati alle displasie ectodermiche AEC e SHFM, inquadrati tra le sindromi EEC-simili. Il costrutto contiene il sito di risposta all'induttore TET, che gli consente di guidare l'espressione del transgene. In questo momento sono in corso gli screening dei topi ottenuti dalla iniezione pronucleare. I topi positivi verranno incrociati con gli induttori (CMV, K14, K18) che nel frattempo abbiamo provveduto a realizzare. Utilizzando i transgenici con il promotore della cheratina 5, abbiamo inoltre dimostrato che l'isoforma DeltaNp63 è in grado di regolare il gene pro-apoptotico della Procaspasi 8. Inoltre abbiamo dimostrato che anche il suo inibitore Flip è sotto il controllo di p63. Infatti nei cheratinociti in coltura l'abbassamento dei livelli di p63 provoca il cambiamento del rapporto delle isoforme di FLIP, che induce l'attivazione della Procaspasi 8 nella sua forma attiva, con la relativa induzione della cascata apoptotica. Quindi p63 è importante nel regolare finemente la via pro/anti apoptotica mediata da FLIP/procaspasi 8 nei cheratinociti.

Validazione array p63 wt/p63Q634X

Per validare i nuovi putativi target di attivazione o repressione di p63, identificati con il nuovo array (vedi UO-01, Prof G Melino) abbiamo messo a punto delle Real Time PCR. Il cDNA templatato per queste reazioni è stato ottenuto per retrotrascrizione di RNA totale estratto a 24 ore dalla trasfezione. Per la validazione abbiamo scelto, come controlli, dei target noti di p63 quali p21, PERP, JAG1, JAG2, DLX2, DLX5, K5 e K14 (queste due cheratine sono risultate upregolate in presenza di p63 anche in cellule SaOS-2 di origine decisamente non epiteliale), mentre fra i nuovi geni target abbiamo scelto di validare i dati relativi all'espressione di geni appartenenti a diversi gruppi ottenuti con il nuovo tipo di analisi bioinformatica utilizzato. I target validati comprendono le cheratine 16 e 17 relativi al differenziamento epiteliale, i geni DSP, DLL1, DLL3, HES5 ed HES7 del pathway di signalling di Notch1, i geni MTUS, MTSS1, cycD1, GADD45A di regolazione del ciclo cellulare, i geni RNF144B, MDM2, SMURF1, HERC4 e HERC6 del pathway dell'ubiquitina. L'espressione dei geni analizzati per Real Time PCR rispecchia i dati ottenuti con l'array e ci permette di fare alcune osservazioni sull'impatto della mutazione Q634X rispetto al ruolo delle isoforme wt. Risulta evidente sia dai dati dell'array che dalle Real Time PCR che la mutazione ha un effetto di "gain of function" sull'attivazione/repressione di molti geni soprattutto quando presente nell'isoforma TA di p63 (fra quelli validati presentano questa risposta PERP, p21, cycD1, MTSS1, K16). E' più diffusa invece una "loss of function" nel caso di DNp63-Q634X (fra i geni validati mostrano tale differente espressione MTUS, K14, DSP). Lo studio dei nuovi geni target delle due isoforme wt e la loro deregolazione in presenza delle isoforme mutanti sarà importante per la comprensione dei pathway alla base della sindrome SHFM derivante dalla presenza di tale mutazione nel gene di p63 (Bellomaria et al., *Cell Cycle*, 2010; Browne et al., *J Cell Sci*, 2011; Rufini et al., *Biochem Pharmacol*, 2011; Sayan et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2010a; Sayan et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2010b; Sayan et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010; Serra et al., *Am J Med Genet A*, 2011; Shalom-Feuerstein et al., *Cell Death Differ*, 2011).

REFERENZE

- Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G (2010) p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 403:13-17.
- Bellomaria A, Barbato G, Melino G, Paci M, Melino S (2010) Recognition of p63 by the E3 ligase ITCH: Effect of an ectodermal dysplasia mutant. *Cell Cycle* 9:3730-3739.
- Bongiorno-Borbone L, De Cola A, Barcaroli D, Knight RA, Di Ilio C, Melino G, De Laurenzi V (2010) FLASH degradation in response to UV-C results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest. *Oncogene* 29:802-810.
- Borrelli S, Candi E, Hu B, Dolfini D, Ravo M, Grober OM, Weisz A, Dotto GP, Melino G, Vigano MA, Mantovani R (2010) The p63 target HBP1 is required for skin differentiation and stratification. *Cell Death Differ* 17:1896-1907.
- Browne G, Cipollone R, Lena AM, Serra V, Zhou H, van Bokhoven H, Dotsch V, Merico D, Mantovani R, Terrinoni A, Knight RA, Candi E, Melino G (2011) Differential altered stability and transcriptional activity of DeltaNp63 mutants in distinct ectodermal dysplasias. *J Cell Sci* 124:2200-2207.
- Busuttill V, Droin N, McCormick L, Bernassola F, Candi E, Melino G, Green DR (2010) NF-kappaB inhibits T-cell activation-induced, p73-dependent cell death by induction of MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18061-18066.
- Chen H, Shalom-Feuerstein R, Riley J, Zhang SD, Tucci P, Agostini M, Aberdam D, Knight RA, Genchi G, Nicotera P, Melino G, Vasa-Nicotera M (2010) miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 394:921-927.
- Dulloo I, Gopalan G, Melino G, Sabapathy K (2010) The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4902-4907.

Lena AM, Cipollone R, Amelio I, Catani MV, Ramadan S, Browne G, Melino G, Candi E (2010) Skn-1a/Oct-11 and DeltaNp63alpha exert antagonizing effects on human keratin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 401:568-573.

Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M (2010) Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 396:335-341.

Notari M, Hu Y, Koch S, Lu M, Ratnayaka I, Zhong S, Baer C, Pagotto A, Goldin R, Salter V, Candi E, Melino G, Lu X (2011) Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16645-16650.

Pagani IS, Terrinoni A, Marengi L, Zucchi I, Chiaravalli AM, Serra V, Rovera F, Sirchia S, Dionigi G, Mozzo M, Frattini A, Ferrari A, Capella C, Pasquali F, Curto FL, Albertini A, Melino G, Porta G (2010) The mammary gland and the homeobox gene Otx1. *Breast J* 16 Suppl 1:S53-56.

Peschiarioli A, Scialpi F, Bernassola F, El Sherbini el S, Melino G (2010) The E3 ubiquitin ligase WWP1 regulates DeltaNp63-dependent transcription through Lys63 linkages. *Biochem Biophys Res Commun* 402:425-430.

Rufini S, Lena AM, Cadot B, Mele S, Amelio I, Terrinoni A, Desideri A, Melino G, Candi E (2011) The sterile alpha-motif (SAM) domain of p63 binds in vitro monoasialoganglioside (GM1) micelles. *Biochem Pharmacol* 82:1262-1268.

Sayan AE, D'Angelo B, Sayan BS, Tucci P, Cimini A, Ceru MP, Knight RA, Melino G (2010a) p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3. *Biochem Biophys Res Commun* 394:824-828.

Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Bernardini S, Tucci P, Vasa-Nicotera M, Knight RA, Melino G (2010b) Induction of TAp63 by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1748-1751.

Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Tucci P, Piro MC, Browne GJ, Agostini M, Bernardini S, Knight RA, Mak TW, Melino G (2010) Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12877-12882.

Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, Muller M (2010) Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 394:817-823.

Schuster A, Schilling T, De Laurenzi V, Koch AF, Seitz S, Staib F, Teufel A, Thorgeirsson SS, Galle PR, Melino G, Stremmel W, Krammer PH, Muller M (2010) DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle* 9.

Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M (2010) Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer* 126:2049-2066.

Serra V, Castori M, Paradisi M, Bui L, Melino G, Terrinoni A (2011) Functional characterization of a novel TP63 mutation in a family with overlapping features of Rapp-Hodgkin/AEC/ADULT syndromes. *Am J Med Genet A*.

Shalom-Feuerstein R, Lena AM, Zhou H, De La Forest Divonne S, Van Bokhoven H, Candi E, Melino G, Aberdam D (2011) DeltaNp63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis. *Cell Death Differ* 18:887-896.

Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Bruno E, Didona B, Paradisi M, Nistico S, Campione E, Napolitano B, Diluvio L, Melino G (2010a) Connexin 26 (GJB2) mutations as a cause of the KID syndrome with hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 395:25-30.

Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Didona B, Bruno E, Nistico R, Giustizieri M, Alessandrini M, Campione E, Melino G (2010b) Connexin 26 (GJB2) mutations, causing KID Syndrome, are associated with cell death due to calcium gating deregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 394:909-914.

Terrinoni A, Pagani IS, Zucchi I, Chiaravalli AM, Serra V, Rovera F, Sirchia S, Dionigi G, Miozzo M, Frattini A, Ferrari A, Capella C, Pasquali F, Curto FL, Albertini A, Melino G, Porta G (2011) OTX1 expression in breast cancer is regulated by p53. *Oncogene* 30:3096-3103.

Vernole P, Muzi A, Volpi A, Terrinoni A, Dorio AS, Tentori L, Shah GM, Graziani G (2011) Common fragile sites in colon cancer cell lines: role of mismatch repair, RAD51 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mutat Res* 712:40-48.

Viticchie G, Lena AM, Latina A, Formosa A, Gregersen LH, Lund AH, Bernardini S, Mauriello A, Miano R, Spagnoli LG, Knight RA, Candi E, Melino G (2011) MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle* 10:1121-1131.

Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, Itie-Youten A, Wakeham A, Arsenian-Henriksson M, Melino G, Kaplan DR, Miller FD, Mak TW (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev* 24:549-560.

Elenco delle pubblicazioni 2010/2011

Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G (2010) p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 403:13-17.

Bellomaria A, Barbato G, Melino G, Paci M, Melino S (2010) Recognition of p63 by the E3 ligase ITCH: Effect of an ectodermal dysplasia mutant. *Cell Cycle* 9:3730-3739.

Bongiorno-Borbone L, De Cola A, Barcaroli D, Knight RA, Di Ilio C, Melino G, De Laurenzi V (2010) FLASH degradation in response to UV-C results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest. *Oncogene* 29:802-810.

Borrelli S, Candi E, Hu B, Dolfini D, Ravo M, Grober OM, Weisz A, Dotto GP, Melino G, Vigano MA, Mantovani R (2010) The p63 target HBP1 is required for skin differentiation and stratification. *Cell Death Differ* 17:1896-1907.

Browne G, Cipollone R, Lena AM, Serra V, Zhou H, van Bokhoven H, Dotsch V, Merico D, Mantovani R, Terrinoni A, Knight RA, Candi E, Melino G (2011) Differential altered stability and transcriptional activity of DeltaNp63 mutants in distinct ectodermal dysplasias. *J Cell Sci* 124:2200-2207.

Busuttill V, Droin N, McCormick L, Bernassola F, Candi E, Melino G, Green DR (2010) NF-kappaB inhibits T-cell activation-induced, p73-dependent cell death by induction of MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18061-18066.

Chen H, Shalom-Feuerstein R, Riley J, Zhang SD, Tucci P, Agostini M, Aberdam D, Knight RA, Genchi G, Nicotera P, Melino G, Vasa-Nicotera M (2010) miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 394:921-927.

Dulloo I, Gopalan G, Melino G, Sabapathy K (2010) The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4902-4907.

Lena AM, Cipollone R, Amelio I, Catani MV, Ramadan S, Browne G, Melino G, Candi E (2010) Skn-1a/Oct-11 and DeltaNp63alpha exert antagonizing effects on human keratin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 401:568-573.

Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M (2010) Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 396:335-341.

Notari M, Hu Y, Koch S, Lu M, Ratnayaka I, Zhong S, Baer C, Pagotto A, Goldin R, Salter V, Candi E, Melino G, Lu X (2011) Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 (IASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16645-16650.

Pagani IS, Terrinoni A, Marengi L, Zucchi I, Chiaravalli AM, Serra V, Rovera F, Sirchia S, Dionigi G, Mozzo M, Frattini A, Ferrari A, Capella C, Pasquali F, Curto FL, Albertini A, Melino G, Porta G (2010) The mammary gland and the homeobox gene *Otx1*. *Breast J* 16 Suppl 1:S53-56.

Peschiarioli A, Scialpi F, Bernassola F, El Sherbini el S, Melino G (2010) The E3 ubiquitin ligase WWP1 regulates DeltaNp63-dependent transcription through Lys63 linkages. *Biochem Biophys Res Commun* 402:425-430.

Rufini S, Lena AM, Cadot B, Mele S, Amelio I, Terrinoni A, Desideri A, Melino G, Candi E (2011) The sterile alpha-motif (SAM) domain of p63 binds in vitro monoasialoganglioside (GM1) micelles. *Biochem Pharmacol* 82:1262-1268.

Sayan AE, D'Angelo B, Sayan BS, Tucci P, Cimini A, Ceru MP, Knight RA, Melino G (2010a) p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3. *Biochem Biophys Res Commun* 394:824-828.

Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Bernardini S, Tucci P, Vasa-Nicotera M, Knight RA, Melino G (2010b) Induction of TAp63 by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1748-1751.

Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Tucci P, Piro MC, Browne GJ, Agostini M, Bernardini S, Knight RA, Mak TW, Melino G (2010) Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12877-12882.

Schilling T, Kairat A, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Oren M, Muller M (2010) Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 394:817-823.

Schuster A, Schilling T, De Laurenzi V, Koch AF, Seitz S, Staib F, Teufel A, Thorgeirsson SS, Galle PR, Melino G, Stremmel W, Krammer PH, Muller M (2010) DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle* 9.

Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M (2010) Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int J Cancer* 126:2049-2066.

Serra V, Castori M, Paradisi M, Bui L, Melino G, Terrinoni A (2011) Functional characterization of a novel TP63 mutation in a family with overlapping features of Rapp-Hodgkin/AEC/ADULT syndromes. *Am J Med Genet A*.

Shalom-Feuerstein R, Lena AM, Zhou H, De La Forest Divonne S, Van Bokhoven H, Candi E, Melino G, Aberdam D (2011) DeltaNp63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis. *Cell Death Differ* 18:887-896.

Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Bruno E, Didona B, Paradisi M, Nistico S, Campione E, Napolitano B, Diluvio L, Melino G (2010a) Connexin 26 (GJB2) mutations as a cause of the KID syndrome with hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 395:25-30.

Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Didona B, Bruno E, Nistico R, Giustizieri M, Alessandrini M, Campione E, Melino G (2010b) Connexin 26 (GJB2) mutations, causing KID Syndrome, are associated with cell death due to calcium gating deregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 394:909-914.

Terrinoni A, Pagani IS, Zucchi I, Chiaravalli AM, Serra V, Rovera F, Sirchia S, Dionigi G, Miozzo M, Frattini A, Ferrari A, Capella C, Pasquali F, Curto FL, Albertini A, Melino G, Porta G (2011) OTX1 expression in breast cancer is regulated by p53. *Oncogene* 30:3096-3103.

Vernole P, Muzi A, Volpi A, Terrinoni A, Dorio AS, Tentori L, Shah GM, Graziani G (2011) Common fragile sites in colon cancer cell lines: role of mismatch repair, RAD51 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mutat Res* 712:40-48.

Viticchie G, Lena AM, Latina A, Formosa A, Gregersen LH, Lund AH, Bernardini S, Mauriello A, Miano R, Spagnoli LG, Knight RA, Candi E, Melino G (2011) MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle* 10:1121-1131.

Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, Itie-Youten A, Wakeham A, Arsenian-Henriksson M, Melino G, Kaplan DR, Miller FD, Mak TW (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev* 24:549-560.

Elenco delle comunicazioni a congressi 2010-2011

- . Workshop "Death in the Alps". Obergurgl (Innsbruck, Austria). 6-9 Jan 2010.
- . Oak Foundation Review, University Oxford, UK. 12 Jan 2010.
- . AACR Special Conference: Cell death mechanisms and cancer therapy. San Diego, CA, 1-4 Feb 2010.
- . Cell Death & Immunity Conference, Sao Paulo, Brasil. 8-11 Feb 2010.
- . German Society Cell Biology. Regensburg. 10-13 Mar 2010.
- . Ceinge Institute Workshop. Napoli 15-16 Mar 2010.
- . Chair. 2nd Sino-MRC conference on "Cell Death". Shanghai, China. 4-7 Apr 2010.
- . 1st Conference of the European Research Institute for Integrated Cellular Pathology (ERI-ICP) on "Integrated Cellular Pathology: Death, Danger & Degeneration", Institut Pasteur, Paris April 22-23, 2010.
- . Science Foundation Ireland. Dublin, IR. 3-4 May 2010.
- . Nobel Conference, 200 anniversary Karolinska, Nobel Forum. Stockholm, S. 23-27 May 2010.
- . Pharmacology Workshop, European Brain Res Inst, Cosenza. 3-4 Jun 2010.
- . Chair. Stem Cells at CNR. Rome. 1-2 Jul 2010
- . IARC, p53 isoforms, workshop. Lyon, France. 13-15 Sep 2010.
- . Antonini Prize. Italian Biochemical Society, Milan. 14-17 Sep 2010.
- . 6th Swiss Apoptosis Meeting. Bern, CH. 29-30 Sep 2010.
- . Italian Cancer Society. Rome. 3-6 Oct 2010.
- . 15th p53 workshop. Philadelphia, PA,, USA. 8-12 Oct 2010.
- . Italian Pathology Society. Salerno. 14-17 Oct 2010.
- . Chair, Organizer. FEBS meeting on Cancer Metabolism. Capri, Italy. 23-26 Oct 2010.
- . Publishing Forum, Wiley-Blackwell. Oxford, UK. 1-2 Dec 2010.
- . Keynote Medal. Portuguese Biochemical Society. Porto, P. 15-17 Dec 2010.
- . Chair, Organizer. Cell Signalomics. Luxemburg. 26-29 Jan 2011.
- . Keynote. Indian Assoc Cancer Res. Kolkata, India. 6-9 Feb 2011.
- . Chair. EMBO Workhop "Death in the Alps". Obergurgl (Innsbruck, Austria). 10-14 Feb 2011.
- . Keynote. Shanghai Biology Conference. 23-26 Mar 2011.
- . In-Cosmetics Fair, Avant. Milan, I. 30 Mar 2011.
- . Chair. 2nd Sino-MRC conference on "Cell Death". Shanghai, China. 19-21 May 2011.
- . Mutant p53 workshop. Ariccia, Italy. 22-24 May 2011.
- . ICDS Meeting. Sao Paulo, Brasil. 10-13 Jun 2011.
- . Organizer. Stress Meeting. Salerno. 23-26 Jun 2011.
- . Organizer. FEBS Meeting. Turin, Italy. 25-30 Jun 2011.
- . ESDR skin biology course. Rome, I. 18-22 Jul 2011.
- . Summer course on Cell Death. Montalcio, Tuscany, I. 6-13 Aug 2011.
- . 1st Australian Cell Death Workshop. Lindemann Island, Aus. 21-15 Aug 2011.
- . DZNE Conference, Bonn, Germany. 1-4 Sep 2011.
- . Chair. 5th p63/p73 workshop. IARC, Lyon, France. 12-14 Sep 2011.
- . 19th ECDO Conference. Sockholm, Sweden. 14-17 Sep 2011.