

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare
Ciclo XXVIII

RUOLO DI CLUSTERINA NELLA PROGRESSIONE DEL TUMORE PROSTATICO

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Valeria Dall'Asta

Tutor:

Chiar.mo Prof. Saverio Bettuzzi

Chiar.ma Prof.ssa Federica Maria Angela Rizzi

Dottoranda:
Martina Bonacini

Indice

SOMMARIO	7
1. Introduzione	9
CLUSTERINA.....	11
1.1 IL GENE.....	12
1.2 I TRASCRITTI.....	13
1.3 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA.....	15
1.3.1 IL PROMOTORE.....	15
1.3.2 REGOLAZIONE EPIGENETICA DEL PROMOTORE.....	16
1.4 LA PROTEINA.....	18
1.5 LA STRUTTURA.....	23
1.6 FUNZIONE DI CLU.....	24
1.7 CLU E TUMORIGENESI.....	27
1.7.1 IL TUMORE DELLA PROSTATA.....	27
1.7.2 INSORGENZA E PROGRESSIONE DEL TUMORE DELLA PROSTATA.....	30
1.7.3 CLU E PCa.....	32
1.8 CLU INTRACELLULARE.....	35
1.8.1 LA VIA DI SEGNALAZIONE DI NF-kB.....	35
1.8.2 CLU E NF-kB.....	38
2. Scopo	41
3. Materiali e metodi	45
3.1 CARATTERISTICHE DELLE LINEE CELLULARI E LORO MANTENIMENTO.....	47
3.2 CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU.....	50
3.3 TRASFEZIONE TRANSIENTE DI pIRES-CLUfull e pIRES-mock.....	51
3.4 TRASFEZIONE CON siRNA.....	51
3.5 TRATTAMENTI.....	52
3.5.1 FARMACI EPIGENETICI.....	52
3.5.2 CHEMIOTERAPICI.....	52
3.6 ESTRAZIONE RNA E PREPARAZIONE cDNA.....	53
3.7 RT-PCR E Real-Time PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	53
3.8 ESTRAZIONE PROTEINE, SDS-PAGE E WESTERN BLOT.....	55
3.9 LOCALIZZAZIONE CELLULARE.....	57
3.9.1 FRAZIONAMENTO CELLULARE.....	57

3.9.2 SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA.....	57
3.10 SAGGI DI VITALITÀ, PROLIFERAZIONE E CICLO CELLULARE	59
3.10.1 SAGGIO WST-1	59
3.10.2 SAGGIO CRISTAL VIOLETTO	59
3.10.3 ANALISI FACS MONODIMENSIONALE	60
3.11 ANALISI BIOINFORMATICHE.....	60
3.11.1 ANALISI DEI TSS E DELLE REGIONI REGOLATORIE DI CLU.....	60
3.11.2 ANALISI MICROARRAY	61
3.12 CLONAGGIO DELLE SEQUENZE P1 E P2 NEL PLASMIDE REPORTER pGL462	
3.13 SAGGI IN LUMINESCENZA	63
3.13.1 SAGGIO D'ATTIVITÀ DI P1 E P2.....	63
3.13.2 SAGGIO D'ATTIVITÀ DI p65.....	63
3.14 MODIFICAZIONI EPIGENETICHE.....	65
3.14.1 METHYLATION SPECIFIC PCR.....	65
3.14.2 IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA	65
3.15 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	67
4. Risultati	71
PARTE 1	
I PRODOTTI DEL GENE DI CLU: LE VARIANTI TRASCRIZIONALI CLU 1, CLU 2 E LA PROTEINA.....	
	73
4.1 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU 1 E CLU 2 IN DIFFERENTI LINEE CELLULARI.....	73
4.2 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU 1 E CLU 2 IN LINFOMI NON-HODGKIN TRATTATI CON FARMACI CHEMIOTERAPICI.....	76
4.3 LA PROTEINA ORIGINATA DAL TRASCRITTO CLU 2.....	77
4.4 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU 1 E CLU 2 IN CELLULE TUMORALI PROSTATICHE TRATTATE CON FARMACI EPIGENETICI.....	79
PARTE 2	
LE REGIONI REGOLATRICI DEL GENE	
	83
4.5 ANALISI IN SILICO DEI TSS E DELLE PUTATIVE REGIONI REGOLATORIE DI CLU.....	83
4.6 ATTIVITÀ DEL PROMOTORE P2.....	86
4.7 STATO DI METILAZIONE DELL'ISOLA CpG.....	88

4.8 STATO DELLE MODIFICAZIONI DELLE CODE ISTONICHE IN CELLULE TRATTATE CON I FARMACI EPIGENETICI.....	89
PARTE 3	
IL RUOLO DI CLU NEL PATHWAY DI NF-kB	91
4.9 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU E p65 IN BIOPSIE UMANE DI PROSTATA	91
4.10 CARATTERIZZAZIONE DI CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU.....	92
4.11 PROLIFERAZIONE E CICLO CELLULARE DI CLONI STABILI SOVRAESPRIEMTI CLU.....	94
4.12 LIVELLI DI p65 IN CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU	96
4.13 ATTIVITÀ DI p65 IN CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU	97
4.14 SOVRAESPRESSIONE TRANSIENTE DI CLU IN CELLULE PC3.....	98
4.15 LIVELLI DI p65 IN CELLULE PC3 SOVRAESPRIMENTI CLU	101
4.16 ATTIVITÀ DI p65 IN CELLULE PC3 SOVAESPRIMENTI CLU.....	101
4.17 LIVELLI DI p65 IN CELLULE PC3 IN CUI CLU È SILENZIATO.....	103
4.18 ATTIVITÀ DI p65 IN CELLULE PC3 IN CUI CLU È SILENZIATO	104
4.19 INTERAZIONE TRA CLU E p65.....	106
5. Discussione e conclusioni	107
6. Appendice.....	117
6.1 SOLUZIONI UTILIZZATE	119
6.2 UNITÀ DI MISURA.....	120
7. Bibliografia	121

SOMMARIO

Clusterina (CLU) è una proteina ubiquitaria, presente nella maggior parte dei fluidi corporei e implicata in svariati processi fisiologici. Dalla sua scoperta fino ad oggi, CLU è risultata essere una proteina enigmatica, la cui funzione non è ancora stata compresa appieno. Il gene codifica per 3 varianti trascrizionali identificate nel database NCBI con i codici: NM_001831 (CLU 1 in questo lavoro di tesi), NR_038335 (CLU 2 in questo lavoro di tesi) e NR_045494 (CLU 3 in questo lavoro di tesi). Tutte le varianti sono trascritte come pre-mRNA contenenti 9 esoni e 8 introni e si differenziano per l'esone 1, la cui sequenza è unica e caratteristica di ogni variante. Sebbene in NCBI sia annotato che le varianti CLU 2 e CLU 3 non sono codificanti, tramite analisi bioinformatica è stato predetto che da tutti e tre i trascritti possono generarsi proteine di differente lunghezza e localizzazione cellulare. Tra tutte le forme proteiche ipotizzate, l'unica a essere stata isolata e sequenziata è quella tradotta dall'AUG presente sull'esone 2 che dà origine a una proteina di 449 aminoacidi. Il processo di maturazione prevede la formazione di un precursore citoplasmatico (psCLU) che subisce modificazioni post-traduzionali tra cui formazione di ponti disolfuro, glicosilazioni, taglio in due catene denominate β e α prima di essere secreta come eterodimero $\beta\alpha$ (sCLU) nell'ambiente extracellulare, dove esercita la sua funzione di chaperone ATP-indipendente. Oltre alla forma extracellulare, è possibile osservare una forma intracellulare con localizzazione citosolica la cui funzione non è stata ancora completamente chiarita.

Questo lavoro di tesi si è prefissato lo scopo di incrementare le conoscenze in merito ai trascritti CLU 1 e CLU 2 e alla loro regolazione, oltre ad approfondire il ruolo della forma citosolica della proteina in relazione al signaling di NF- κ B che svolge un ruolo importante nel processo di sviluppo e metastatizzazione del tumore.

Nella prima parte, uno screening di differenti linee cellulari, quali cellule epiteliali di prostata e di mammella, sia normali sia tumorali, fibroblasti di origine polmonare e linfociti di tumore non-Hodgkin, ha permesso di caratterizzare i trascritti CLU 1 e CLU 2. Dall'analisi è emerso che la sequenza di CLU 1 è più corta al 5' rispetto a quella depositata in NCBI con l'identificativo NM_001831 e il primo AUG disponibile per l'inizio della traduzione è localizzato sull'esone 2. È stato dimostrato che CLU 2, al contrario di quanto riportato in NCBI, è tradotto in proteina a partire dall'AUG presente sull'esone 2, allo stesso modo in cui viene tradotto CLU 1. Inoltre, è stato osservato che i livelli d'espressione dei trascritti variano

notevolmente tra le diverse linee cellulari e nelle cellule epiteliali CLU 2 è espressa sempre a bassi livelli. In queste cellule, l'espressione di CLU 2 è silenziata per via epigenetica e la somministrazione di farmaci capaci di rendere la cromatina più accessibile, quali tricostatina A e 5-aza-2'-deossicitidina, è in grado di incrementarne l'espressione.

Nella seconda parte, un'analisi bioinformatica seguita da saggi di attività *in vitro* in cellule epiteliali prostatiche trattate con farmaci epigenetici, hanno permesso di identificare, per la prima volta in uomo, una seconda regione regolatrice denominata P2, capace di controllare l'espressione di CLU 2. Rispetto a P1, il classico promotore di CLU già ampiamente studiato da altri gruppi di ricerca, P2 è un promotore debole, privo di TATA box, che nelle cellule epiteliali prostatiche è silente in condizioni basali e la cui attività incrementa in seguito alla somministrazione di farmaci epigenetici capaci di alterare le modificazioni post-traduzionali delle code istoniche nell'intorno di P2. Ne consegue un rilassamento della cromatina e un successivo aumento di trascrizione di CLU 2. La presenza di un'isola CpG differentemente metilata nell'intorno di P1 spiegherebbe, almeno in parte, i differenti livelli di espressione di CLU che si osservano tra le diverse linee cellulari.

Nella terza parte, l'analisi del pathway di NF- κ B in un modello sperimentale di tumore prostatico in cui CLU è stata silenziata o sovraespressa, ha permesso di capire come la forma citosolica di CLU abbia un ruolo inibitorio nei confronti dell'attività del fattore trascrizionale NF- κ B. CLU inibisce la fosforilazione e l'attivazione di p65, il membro più rappresentativo della famiglia NF- κ B, con conseguente riduzione della trascrizione di alcuni geni da esso regolati e coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare, quali l'urochinasi attivatrice del plasminogeno, la catepsina B e la metallo proteinasi 9. È stato dimostrato che tale inibizione non è dovuta a un'interazione fisica diretta tra CLU e p65, per cui si suppone che CLU interagisca con uno dei componenti più a monte della via di segnalazione responsabile della fosforilazione ed attivazione di p65.

1. Introduzione

CLUSTERINA

Clusterina (CLU) è una glicoproteina secreta espressa nella maggior parte dei tessuti umani ed è presente in quasi tutti i fluidi corporei. Essa è coinvolta in importanti processi biologici, quali interazione cellula-cellula, riproduzione, stress ossidativo, invecchiamento e differenziamento cellulare. È inoltre associata allo sviluppo di varie condizioni patologiche come la neurodegenerazione e il tumore¹⁻³.

La proteina è stata isolata per la prima volta nel 1983 da Fritz e colleghi a partire dal liquido seminale di montone e le è stato attribuito il nome “Clusterin” per la sua capacità di promuovere l’aggregazione *in vitro* delle cellule del Sertoli⁴.

A distanza di poco tempo, specie omologhe di CLU sono state isolate e clonate a partire da diversi organismi da laboratori indipendenti, generando un discreto numero di sinonimi della stessa molecola, quali sulfated glycoprotein 2 (SGP-2), TRPM-2, ApoJ, SP-40. Nell’uomo fu isolata per la prima volta nel 1989 dal plasma e fu denominata “Complement Cytolysis Inhibitor” (CLI)⁵. Solo in un secondo momento è risultato evidente che si trattava di forme omologhe dello stesso prodotto genico a cui è stato dato il nome univoco di Clusterina (CLU)¹. Fin dalla sua scoperta molti gruppi di ricerca si sono interessati a CLU portando ad avere una cospicua produzione scientifica in merito. Ad oggi però ci sono ancora carenze d’informazioni di base su questa proteina. In primo luogo ci sono carenze sulla conoscenza dei meccanismi che ne regolano l’espressione. In secondo luogo, nonostante i molteplici tentativi, non si è mai riusciti ad ottenere cristalli della proteina e le uniche informazioni in merito alla sua struttura tridimensionale sono solo di tipo predittivo. Nonostante CLU sia una glicoproteina extracellulare con funzione di chaperone ATP-indipendente, è possibile osservare, in particolari condizioni di stress, una localizzazione in altri compartimenti cellulari come il citoplasma, i mitocondri e il nucleo. La natura di tali forme proteiche intracellulari è ancora oggetto di dibattito; in particolare non è stato chiarito se si tratta di forme proteiche differenti o semplicemente localizzazioni diverse della stessa proteina. Anche la sua funzione è controversa poiché alcuni gruppi di ricerca la considerano una proteina capace di promuovere la sopravvivenza cellulare, mentre altri sostengono che la inibisca.

Per tutti questi motivi CLU è stata definita una proteina enigmatica e a distanza di 30 anni dalla sua scoperta è ancora l’oggetto di studio di molti gruppi di ricerca indipendenti.

1.1 IL GENE

Nell'uomo il locus genico di CLU mappa sul braccio corto del cromosoma 8 nella posizione di transizione tra le bande 8p21 e 8p12. Nella banca dati "National Center of Biotechnology Information" (NCBI) il gene è identificato con la sequenza di riferimento (RefSeq) denominata NG_027945. Esso si estende per circa 25 kpb ed è composto da 11 esoni di cui i primi tre, definiti in questo lavoro di tesi 1a, 1b e 1c, sono esoni alternativi (Fig.1A). L'"alternative first exon" (AFE) è il fenomeno per cui il primo esone di una variante trascrizionale è localizzato all'interno di una regione intronica di un'altra variante del gene stesso, facendo sì che da un unico gene si possano generare trascritti con sequenze differenti al 5'. Alcuni AFE semplicemente cambiano la regione 5' non tradotta (5'-UTR) senza modificare la proteina prodotta, se invece all'interno dell'AFE è presente un codone d'inizio si generano proteine diverse. Nel caso di CLU, l'esone 1a è quello posto più a monte, e nell'ordine seguono gli esoni alternativi 1c e 1b. In successione si trovano poi i restanti esoni denominati da 2 a 9, comuni a tutte le varianti trascrizionali. Il gene di CLU è stato studiato non solo in uomo, ma anche in altre specie e sono state osservate caratteristiche simili⁶.

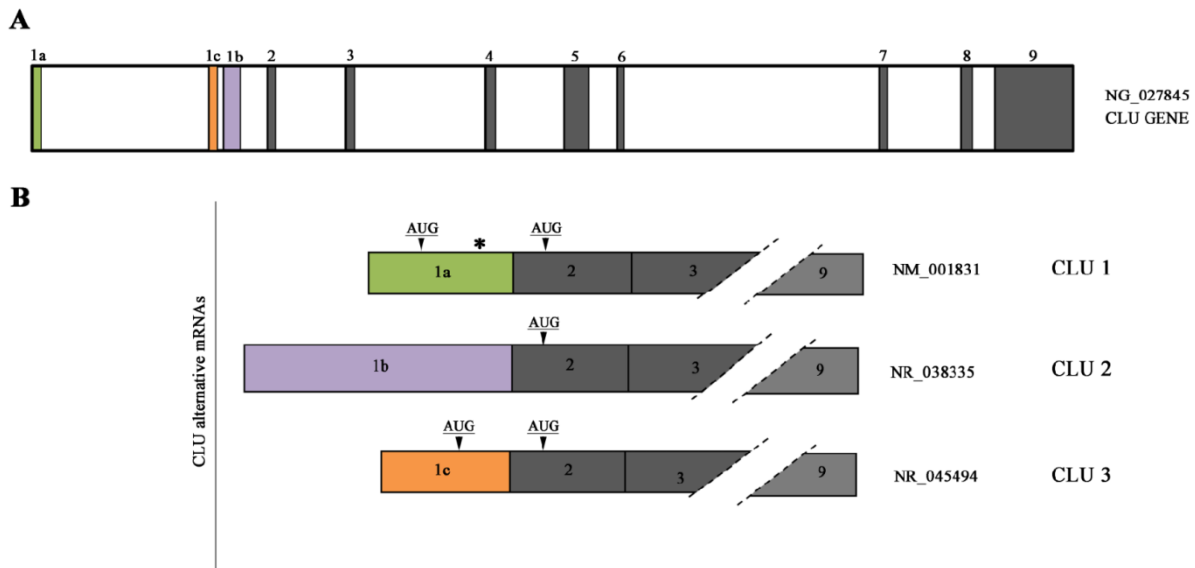


Fig.1 Clusterina: il gene e i trascritti.

A) Rappresentazione del gene di CLU; in verde, viola e arancio rispettivamente gli esoni unici alternativi 1a, 1b e 1c, mentre in grigio gli esoni comuni a tutte le varianti. B) Varianti trascrizionali annotate in NCBI come RefSeq: CLU 1 (NM_001831), CLU 2 (NR_038335) e CLU 3 (NR_045494). L'asterisco presente nell'esone 1a identifica la posizione della TATA box.

1.2 I TRASCritti

Fino al 2006 si riteneva che dal gene di CLU si originasse un unico trascritto di 1.9 kpb (identificativo NCBI M64722) contenente due AUG in frame: il primo localizzato nell'esone 2 e il secondo localizzato nell'esone 3.

Negli anni successivi sono stati associati al gene di CLU altri trascritti e un recente aggiornamento della banca dati NCBI identifica nell'uomo come RefSeq tre varianti trascrizionali: NM_001831; NR_038335; NR_045494. In Tabella 1 sono riportati i trascritti RefSeq a oggi annotati in NCBI e la loro definizione.

Tabella 1: Definizione delle sequenze secondo NCBI.

GeneBank ID	Definizione	Descrizione
NM_001831	Variante 1	Codifica per una pre-pro-proteina funzionale.
NR_038335	Variante 3	Possiede al 5' un esone diverso rispetto alla variante 1. Questo mRNA rappresenta una variante non codificante a causa della presenza di una Open Reading Frame (ORF) a monte rispetto all'ORF principale che interferisce con la traduzione della ORF principale. La traduzione della ORF a monte rende questo trascritto un candidato per il decadimento mediato da nonsense (NMD).
NR_045494	Variante 4	Possiede al 5' un esone diverso rispetto alla variante 1. Questo mRNA rappresenta una variante non codificante a causa della presenza di una ORF a monte rispetto all'ORF principale che interferisce con la traduzione della ORF principale. La traduzione della ORF a monte rende questo trascritto un candidato per il NMD.

Questi trascritti hanno un esone 1 unico e condividono la restante sequenza nucleotidica dall'esone 2 al 9 (Fig.1B). Si identifica con 1a l'esone 1 della variante NM_001831, con 1b il primo esone del trascritto NR_038335 e con 1c l'esone 1 della variante NR_045494. In questo lavoro di tesi le varianti trascrizionali vengono identificate rispettivamente come CLU 1, CLU 2 e CLU 3. La traduzione della proteina isolata da plasma e caratterizzata ha inizio a partire dal codone AUG presente nell'esone 2 e potenzialmente tutti e tre i trascritti sarebbero in grado di generare una proteina di 449 aa. In NCBI è riportato che le varianti NR_038335 e NR_045494 sono mRNA non codificanti, ma tale definizione è stata assegnata solo in seguito ad una analisi computazionale non accompagnata da dati sperimentali *in vivo* o *in vitro*.

La vecchia sequenza **M64722** attualmente non rientra più tra le RefSeq, ma ha un'identità di sequenza del 99% con la variante **NM_001831**. Entrambi i trascritti possiedono la porzione 3' dell'esone 1a, mentre la porzione al 5' è più estesa di 140 basi per la variante NM_001831.

1. Introduzione

È interessante notare che il completo sequenziamento dell'esone 1a ha rilevato la presenza di un AUG potenzialmente funzionante, posto a monte rispetto a quello presente sull'esone 2, che può essere tradotto in una proteina di 501 aa (<http://web.expasy.org/translate/>). Bisogna inoltre aggiungere che all'interno dell'esone 1a della variante NM_001831 è presente la sequenza TATA box a cui si legherebbe l'RNAPolimerasi II e tutto il macchinario della trascrizione. Questo è quantomeno insolito poiché normalmente la TATA box si trova 30 basi a monte rispetto al sito d'inizio della trascrizione (TSS) e non all'interno di un esone del gene. L'esone 1b della variante **NR_038335** manca di un AUG e il potenziale sito d'inizio della traduzione sarebbe localizzato nell'esone 2. L'esone 1c della variante **NR_045494**, come accade per l'esone 1a, contiene un AUG funzionale da cui è predetta la produzione di una proteina di 460 aa (<http://web.expasy.org/translate/>).

Dalla letteratura si evince che i trascritti più studiati sono le varianti CLU 1 e CLU 2, mentre le informazioni riguardanti CLU 3 sono più limitate. L'abbondanza relativa di CLU 1 e CLU 2, è stata studiata in differenti tipologie di tessuto e da quest'analisi è emerso che il rapporto tra i livelli di espressione delle due varianti cambia considerevolmente in base al tessuto preso in esame⁷. Recentemente Prochnow e collaboratori hanno valutato l'abbondanza assoluta delle varianti trascrizionali in linee cellulari tumorali di rene, mammella e prostata. Da questo studio è emerso che il trascritto che maggiormente contribuisce alla quantità totale dell'mRNA di CLU è la variante CLU 1, non intesa nella sua interezza ma come sequenza con l'esone 1a più corto al 5' di 118 basi (Fig.2). L'esone 1a amplificato è privo sia della TATA box sia dell'AUG in frame da cui potenzialmente potrebbe partire la traduzione della variante NM_001831. Invece, le varianti CLU 2 e CLU 3 contribuiscono solo per lo 0.009% al contenuto totale di mRNA di CLU⁸. Le varianti trascrizionali di CLU sono anche state studiate in relazione a differenti patologie al fine di trovare una correlazione tra i livelli di espressione e uno stato patologico. Uno studio condotto su biopsie di colon normale e tumorale ha evidenziato come i livelli di espressione di CLU 2 siano sempre più bassi nel tumore rispetto alla mucosa normale⁹. Ling e collaboratori hanno, invece, trovato una correlazione tra CLU 1 e un polimorfismo a singolo nucleotide associato a un differente rischio di sviluppare l'Alzheimer⁷. Sono stati inoltre identificati alcuni stimoli capaci di regolare differenzialmente l'espressione di CLU 1 e CLU 2. Ad esempio, in cellule tumorali prostatiche è stato osservato che gli androgeni hanno un effetto opposto sui livelli di espressione delle due varianti. In seguito alla somministrazione di androgeni, le cellule

LNCaP mostrano una diminuzione dei livelli di espressione di CLU 1, in concomitanza ad un aumento dei livelli di espressione di CLU 2¹⁰. Il fattore 1 delle cellule T (TCF-1), un fattore di trascrizione a valle della segnalazione Wnt, è in grado di promuovere specificatamente l'espressione di CLU 1, ma non quella di CLU 2 o CLU 3 in cellule tumorali di colon¹¹. Anche in questo caso gli autori sottolineano il fatto che l'mRNA up-regolato da TCF-1 non corrisponde esattamente alla sequenza NM_001831, ma è una sequenza con un esone 1a più corto al 5' (privo della sequenza TATA box e dell'AUG in frame).

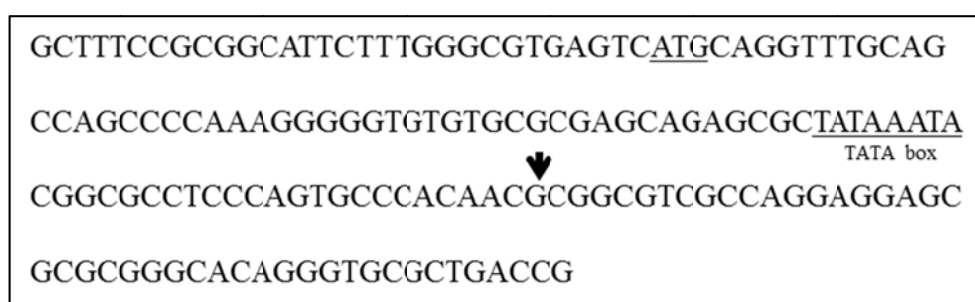


Fig.2 Esone 1a.

Sequenza dell'esone 1a della variante annotata in NCBI come NM_001831. L'ATG sottolineato è il potenziale sito d'inizio traduzione rilevato dopo il completo sequenziamento dell'esone 1a. Da questo ATG avrebbe origine una proteina di 502 aa. In figura è sottolineata anche la posizione della TATA box. La freccia indica l'inizio della sequenza ritrovata da Prochnow e colleghi nonché la sequenza dell'esone 1 della variante di Leskov^{8,12}.

Bisogna sottolineare che in letteratura è stato individuato un ulteriore trascritto rispetto a quelli annotati in NCBI come RefSeq, definito variante di Leskov¹². Questo mRNA ha origine da un evento di splicing alternativo in cui l'esone 1a, più corto di 118 basi al 5' (Fig.2) e quindi privo di un AUG al suo interno, è direttamente legato all'esone 3. La perdita dell'esone 2 fa sì che la traduzione abbia inizio dall'AUG presente sul terzo esone. È da sottolineare il fatto che questo trascritto è raro, i livelli di espressione oscillano tra 0.008-0.001% rispetto all'mRNA totale di CLU, ed inoltre è stato rinvenuto solo nelle linee cellulari MCF7, HEK-293 e PC3^{8,12}.

1.3 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

1.3.1 IL PROMOTORE

L'espressione di CLU in uomo è controllata da un promotore a monte dell'esone 1a di CLU 1. La prima analisi di sequenza di questa regione regolatrice è stata condotta nel 1994 da Wong e collaboratori quando ancora in NCBI era annotata un'unica sequenza di riferimento

1. Introduzione

(M64722). Secondo tale analisi il promotore di CLU possiede una TATA box e una CAAT box localizzate rispettivamente in posizione -26 e -93 rispetto al TSS. Sono stati inoltre individuati nella regione da -73 a -87, putativi siti di legame per elementi regolatori quali la proteina attivatrice 1 (AP1) e la proteina specifica 1 (SP1)¹³.

Michael e colleghi hanno individuato un dominio di 14 pb, che risulta altamente conservato in uomo, ratto, topo e quaglia, e denominato “Clusterin Element” (CLE)¹⁴. La sequenza CLE appare strettamente correlata a quella consenso riconosciuta dagli elementi di risposta allo shock termico (HSE), dal quale differisce solo per una base. Il singolo mismatch nel motivo centrale nGAAn non appare significativo, infatti CLE è riconosciuto dal fattore di trascrizione dello shock termico 1 (Heat Shock Factor 1, HSF1) e sembra sia in grado di mediare la trascrizione indotta da shock termico¹⁵.

Negli anni successivi molti gruppi di ricerca si sono interessati alla regolazione di CLU e sono stati individuati numerosi fattori di trascrizione capaci di modularne l’espressione. In Tabella 2 è riportato l’elenco di tutti i fattori trascrizionali leganti il promotore di CLU e verificati sperimentalmente.

Tabella 2: Stato dell’arte sulla regolazione trascrizionale di CLU.

Fattore di trascrizione	Elemento di legame al DNA	Metodi	Referenza
HIF-1a	HREs	Saggio di luciferasi, EMSA, ChIP	Park J et al. ¹⁶
Twist 1	E-box	Saggio di luciferasi, ChIP	Takeuchi A et al. ¹⁷ ; Shiota M et al. ¹⁸
MYCN	E-box non canonica	Saggio di luciferasi, EMSA, ChIP	Corvetta D et al. ¹⁹
Fattore TGF- β dipendente	AP1	Saggio di luciferasi	Klokov D et al. ²⁰
YB-1	E-box	Saggio di luciferasi, ChIP	Shiota M et al. ²¹
B-Myb	Sequenza consenso Myb	Saggio di luciferasi, EMSA	Cervellera M et al. ²²

1.3.2 REGOLAZIONE EPIGENETICA DEL PROMOTORE

Fin dalla prima caratterizzazione del promotore umano ci sono state evidenze che hanno portato a pensare a una possibile regolazione per via epigenetica di CLU. Wong e colleghi trovarono nella regione compresa tra la TATA box e il TSS un’isola CpG, cioè una sequenza ricca in C e G suscettibile a metilazione¹³. L’ipermetilazione a livello delle isole CpG di un

promotore determina una riduzione dei livelli di espressione del gene poiché rende la cromatina meno accessibile al macchinario trascrizionale. È stata osservata una correlazione tra lo stato di metilazione del promotore e l'espressione di CLU sia in linee cellulari sia in campioni di tessuto umano: bassi livelli di mRNA sono associati a un'ipermetilazione dell'isola CpG²³⁻²⁵. Ad esempio nel lavoro di Rauhala e colleghi, il sequenziamento genomico con bisolfito eseguito su 4 differenti linee cellulari di tumore prostatico umano, ha mostrato come le cellule con i più bassi livelli di CLU siano quelle che presentano livelli di metilazione del promotore più elevati²³.

In seguito alla somministrazione di farmaci epigenetici che alterano l'attività di proteine coinvolte sia nella metilazione diretta del DNA, sia nelle modificazioni post-traduzionali delle proteine ad esso associato, quali gli istoni, è stato osservato un aumento dell'espressione di CLU. Gruppi di ricerca indipendenti hanno osservato che la somministrazione di farmaci epigenetici, quali acido valproico, depsipeptide, tricostatina A (TSA) o 5-aza-2'-deossicitidina (AZDC) in differenti linee cellulari umane determina un aumento di CLU. L'acido valproico è un inibitore selettivo dell'istone deacetilasi (HDAC) di classe II, una famiglia di proteine che agiscono impedendo la rimozione del gruppo acetile dagli istoni, con conseguente cambiamento dell'espressione genica poiché la cromatina risulta più accessibile ai fattori di trascrizione. Depsipeptide e TSA determinano un incremento dell'accessibilità della cromatina non solo inibendo le HDAC di classe II, ma anche quelle di classe I. Anche l'AZDC è un farmaco che incrementa l'accessibilità della cromatina e agisce inibendo la demetilazione normalmente operata dagli enzimi DNA metiltransferasi. È stato osservato che la somministrazione di acido valproico in cellule neuronali determina un incremento del livello di proteina di CLU²⁶. Allo stesso modo, in cellule della retina, è stato dimostrato che il trattamento con TSA singolarmente, o in combinazione con AZDC, causa un up-regolazione della proteina CLU²⁷.

Hellebrekers e colleghi mediante un'analisi microarray hanno identificato CLU tra i geni down-regolati in cellule endoteliali umane cresciute in mezzo condizionato da fattori tumorali rispetto alle stesse mantenute in stato quiescente. Essi dimostrano come la somministrazione di TSA e AZDC determini un incremento dei livelli del trascritto totale di CLU²⁸. Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato mediante sequenziamento con bisolfito ed esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) come, in questo particolare tipo cellulare, il silenziamento di CLU sia dovuto, almeno in un primo momento, a cambiamenti nelle code istoniche che rendono la cromatina più accessibile, senza però un coinvolgimento immediato

1. Introduzione

dello stato di metilazione dell'isola CpG. Hanno dimostrato che la somministrazione di TSA e AZDC determina, a livello della regione al 5' del gene di CLU, un aumento delle modifiche istoniche associate a uno stato di cromatina accessibile al macchinario di trascrizione, quali acetilazione dell'istone H3 (AcH3) e trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3). Gli autori ipotizzano che l'ipermetilazione diretta del promotore subentri a tempi lunghi, rendendo il silenziamento irreversibile²⁸.

In cellule di neuroblastoma è stato dimostrato come l'espressione di CLU sia mantenuta a bassi livelli da EZH2, un metiltransferasi implicata nelle repressione trascrizionale²⁹. EZH2 influenza l'espressione di CLU modificando l'accessibilità della cromatina a livello del promotore del gene, poiché promuove la trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3), un marker di repressione trascrizionale. La somministrazione di depsipeptide a queste cellule determina una up-regolazione di CLU in seguito alla riduzione dei livelli di H3K27me3 sul promotore del gene e un aumento di H3K4me3²⁹.

I dati presenti in letteratura valutano gli effetti della somministrazione di farmaci epigenetici sulla regolazione trascrizionale di CLU analizzando la quantità totale di mRNA e la forma proteica. Tuttavia ad ora non sono disponibili dati in merito alla regolazione epigenetica delle singole varianti trascrizionali.

1.4 LA PROTEINA

Dall'analisi computazionale dei trascritti sopra descritti risulta la possibilità di generare proteine a differente peso molecolare e localizzazione cellulare. La traduzione a partire dall'AUG presente nell'esone 2 porta alla formazione di una proteina di 449 aa con una predetta localizzazione extracellulare e sulla membrana esterna. Questa proteina può avere origine da tutti e tre i trascritti RefSeq in quanto la traduzione ha inizio nella porzione comune alle tre varianti. A differenza della definizione "non codificante" di NCBI, è stato dimostrato sperimentalmente che non solo il cDNA corrispondente a CLU 1, ma anche quello corrispondente a CLU 2 e CLU 3 dà origine alla proteina di 449 aa. I livelli di proteina tradotti dai cDNA di CLU 2 e CLU 3 sono di molto inferiori a quelli generati a partire da CLU 1⁸. Nell'esone 1a di CLU 1 è presente un AUG in frame con la ORF principale e la proteina predetta che ne deriva ha 501 aa e una localizzazione nucleare/citoplasmatica (PSORT, <http://psort.hgc.jp/>). Anche nell'esone 1c di CLU 3 è presente un AUG in frame con la ORF principale e la proteina che ne deriva è costituita da 460 aa e ha una putativa

localizzazione nucleare/citoplasmatica (PSORT, <http://psort.hgc.jp/>). Un altro AUG da cui potrebbe avere inizio la traduzione è quello presente sull'esone 3 e la proteina che ne deriva, formata da 416 aa, avrebbe una localizzazione nucleare/citoplasmatica (PSORT, <http://psort.hgc.jp/>). Poiché tutti i trascritti, compreso la variante di Leskov, possiedono questo AUG localizzato sull'esone 3, potenzialmente la proteina potrebbe essere prodotta da ognuna delle varianti di mRNA descritte in precedenza.

La traduzione a partire dal secondo esone produce la proteina più abbondante e meglio caratterizzata, ma soprattutto l'unica forma ad essere mai stata isolata e sequenziata³⁰. Il modello di biogenesi proposto prevede che la pre-pro-proteina, che viene prodotta a partire dai ribosomi ancorati al reticolo endoplasmatico (RE) rugoso, presenta nella porzione N-terminale un peptide segnale di 22 aa necessario per l'indirizzamento della proteina al pathway secretorio³¹. Una volta nel lume del RE il peptide segnale è rimosso da una specifica peptidasi mentre la catena polipeptidica continua ad allungarsi fino al completamento della traduzione. La pro-proteina neosintetizzata con un peso di circa 50 kDa subisce a questo punto diverse modificazioni post-traduzionali tra cui glicosilazioni, formazione di ponti disolfuro e taglio proteolitico con formazione di due subunità (catena β all'N-terminale e catena α al C-terminale). Il primo step del processo di maturazione prevede il ripiegamento del polipeptide a livello della zona di giunzione tra le catene β e α e la successiva formazione di cinque ponti disolfuro tra residui di cisteina simmetricamente opposti della catena β (C102, C113, C120, C128) e della catena α (C313, C305, C302, C286, C285)^{5,32}. Secondo il modello proposto da Lakins e collaboratori, la proteina viene glicosilata tramite l'aggiunta e la successiva modifica di oligosaccaridi³¹. Un'analisi della massa ha permesso di identificare tre siti di N-glicosilazione sulla catena β (N64, N81, N123) e tre siti sulla catena α (N64, N127, N147), mentre non sono state rinvenute né O-glicosilazioni né oligosaccaridi solfonati³³. Sempre secondo il modello di Lakins, la pro-proteina ad alto tenore di mannosio (peso molecolare 64 kDa) viene poi deglicosilata dall'azione sequenziale di glucosidasi e mannosidasi prima di essere trasportata nelle cisterne cis del Golgi dove, in seguito ad ulteriori modifiche delle catene oligosaccaridiche, è convertita nella pro-proteina a basso contenuto di mannosio (peso molecolare 56 kDa). Tale intermedio proteico può intraprendere un pathway di secrezione costitutiva in cui si ha l'aggiunta di catene di carboidrati che portano alla formazione della pro-proteina completamente glicosilata a peso molecolare di 76 kDa. La maturazione della proteina è completata nelle cisterne trans del Golgi, dove

1. Introduzione

endopeptidasi residenti catalizzano il taglio della pro-proteina tra i residui R227 e S228 generando le catene β e α ³⁴. In alternativa, l'intermedio a basso contenuto di mannosio (peso molecolare 56 kDa) intraprende un pathway di secrezione regolato in cui la pro-proteina è impacchettata nei granuli secretori del trans-Golgi e immagazzinata in attesa di un segnale che dia il via all'esocitosi (Fig.3).

Al termine del processo di sintesi e maturazione, CLU si presenta come una glicoproteina eterodimerica di 75-80 kDa, composta da due subunità, legate da ponti disolfuro, denominate β (residui 23-277), del peso di 34-36 kDa, ed α (residui 228-449), del peso di 36-39 kDa. In un'analisi SDS-PAGE in condizioni denaturanti, la proteina è identificata da due bande distinte rispettivamente di 60-70 e 34-39 kDa. La prima banda corrisponde al precursore non ancora processato, mentre la seconda identifica le catene β e α , che avendo all'incirca lo stesso peso, non è possibile separare su gel.

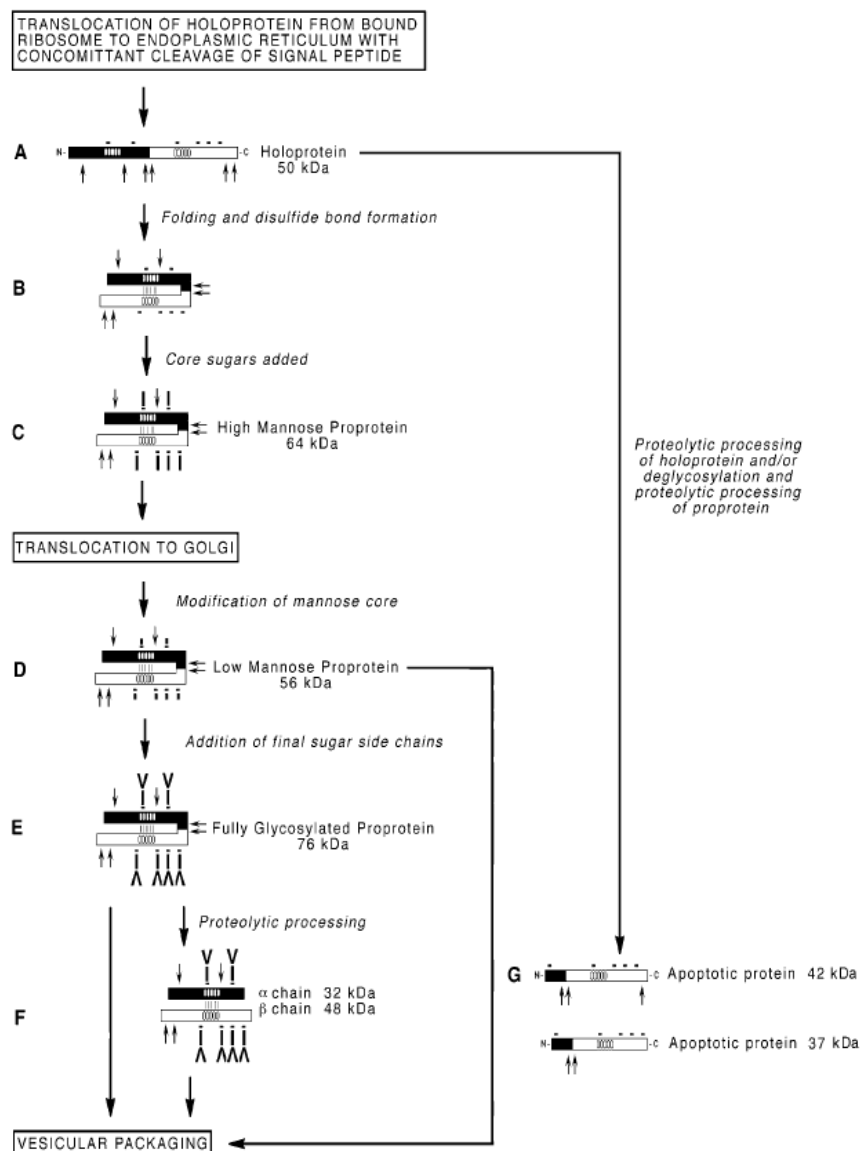


Fig.3 Modello ipotetico di biogenesi di CLU di Lakins³¹.

A) In seguito alla traduzione del peptide segnale si ha la traslocazione al RE della proteina nascente. Contemporaneamente alla rimozione del peptide segnale si ha il completamento della traduzione. **B)** Terminata la traduzione si ha il ripiegamento della pro-proteina e formazione dei ponti disolfuro. **C)** Nel lume del RE la pro-proteina subisce l'aggiunta di oligosaccaridi generando la forma ad alto contenuto di mannosio di 64 kDa. Prima del trasferimento all'apparato del Golgi, mannosidasi e glicosidasi modificano le catene oligosaccaridiche. **D)** Nel Golgi subisce ulteriori modificazioni ed è convertita nella pro-proteina a basso contenuto di mannosio dal peso di 56 kDa. La pro-proteina a basso tenore di mannosio può prendere due vie differenti: pathway di secrezione costitutiva o regolato. **E)** Nel caso del pathway di secrezione costitutiva si ha un'ulteriore aggiunta di catene di carboidrati che determina la formazione della pro-proteina completamente glicosilata a peso molecolare di 76 kDa. **F)** Nelle cisterne del trans-Golgi endopeptidasi catalizzano il taglio tra le catene β e α . La proteina a questo punto è pronta per l'impacchettamento nelle vescicole e la successiva secrezione. Nel pathway di secrezione regolato, l'intermedio della pro-proteina del peso di 56 kDa è impacchettato nelle vescicole secretorie in attesa di un segnale per la secrezione. **G)** Secondo Lakins e colleghi la presenza entro la cellula di una forma proteica a peso molecolare di circa 40 kDa può avere origine in seguito al taglio in un sito criptico tra un residuo di Arginina e uno di Serina della pro-proteina non ancora glicosilata. In tal modo si generano due forme proteiche dal peso molecolare presunto di 42 e 37 kDa.

1. Introduzione

Nel 1996 Reddy e colleghi hanno dimostrato per la prima volta l'esistenza di una forma nucleare di CLU con un peso molecolare pari a 43 kDa in cellule epiteliali indotta in risposta al trattamento con il fattore di crescita trasformante β (TGF β)³⁵. Pochi anni dopo Yang e collaboratori identificano una forma nucleare di CLU di 55 kDa in cellule MCF7 sottoposte a radiazioni ionizzanti³⁶. In seguito altri autori hanno confermato la produzione di una forma di CLU dal peso molecolare tra 45 e 55 kDa non glicosilata con localizzazione nucleare¹². Sperimentalmente è stato visto che la trasfezione di un costrutto artificiale corrispondente al cDNA di CLU privo dei primi due esoni in linee cellulari epiteliali di tumore prostatico genera una proteina tronca con localizzazione nucleare e peso molecolare di 49 kDa³⁷. Il meccanismo attraverso cui, in particolari condizioni di stress della cellula, si ha l'indirizzamento della proteina al nucleo non è stato completamente chiarito. È noto che nella sequenza amminoacidica di CLU sono presenti tre putativi segnali di localizzazione nucleare, ma è stato dimostrato che nessuno di questi è indispensabile per l'indirizzamento della proteina al nucleo³⁷.

In particolari condizioni di stress, ad esempio in seguito al blocco del proteasoma, si osserva in western blot (WB) la comparsa di bande immunoreattive aggiuntive rispetto a quelle corrispondenti al precursore non processato (psCLU) e alle singole catene β e α (sCLU) (Fig.4). Le modalità con cui vengono generate nella cellula queste forme non sono ancora state completamente chiarite e sono stati proposti diversi meccanismi tra cui: traduzione di trascritti rari, inizio alternativo della traduzione e retrotraslocazione dall'apparato del Golgi al citoplasma^{8,12,38-40}. Mediante esperimenti di trasfezione di cDNA corrispondenti alle varianti trascrizionali e mutagenesi sito specifica, Prochnow e collaboratori hanno tentato di associare le bande immunoreattive che si osservano in WB alle varianti di trascritto e ne hanno valutato la localizzazione cellulare⁸. Oltre alla forma secreta (psCLU e sCLU), in particolari condizioni di stress è possibile, a partire dall'AUG presente sull'esone 2, la formazione di una proteina sempre di 449 aa di 50 kDa che però non subisce glicosilazioni e si localizza nel citoplasma (CLU₁₋₄₄₉) (Fig.4). Inoltre, la traduzione che inizia da un sito non canonico presente sull'esone 2 dà origine anch'essa a una proteina citosolica non glicosilata di 50 kDa (CLU₂₁₋₄₄₉) che in WB risulta indistinguibile dalla forma CLU₁₋₄₄₉ (Fig.4). Un'ulteriore forma proteica possibile, tradotta a partire dall'AUG posto nell'esone 3, ha un peso molecolare di 45 kDa ed una localizzazione citoplasmatica (CLU₃₄₋₄₄₉) (Fig.4). Quest'ultima forma può avere origine sia dai trascritti RefSeq sia dalla variante di Leskov. Tuttavia è importante rimarcare il fatto che queste forme proteiche si osservano solo in condizioni di stress della cellula e non

sono mai state isolate *in vivo* né tantomeno sequenziate. Ad oggi l'unica proteina identificata *in vivo* e caratterizzata rimane la forma secreta di 449 aa che in WB è associata a due bande distinte rispettivamente di 60-70 e 34-39 kDa.

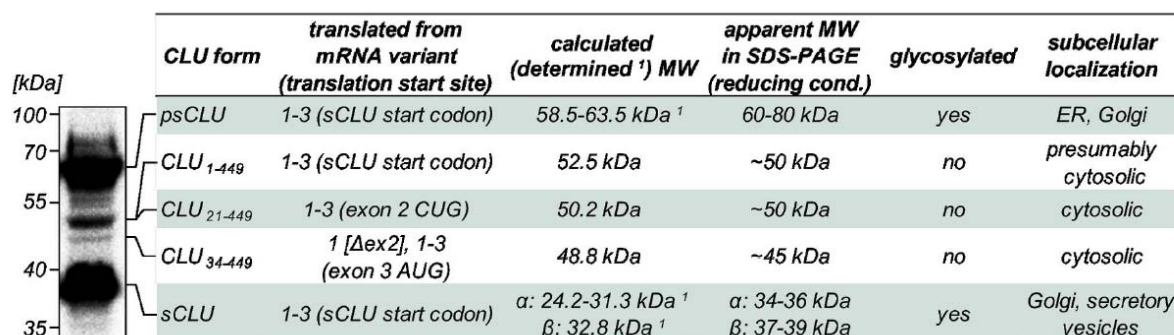


Fig.4 Corrispondenze tra bande immunoreattive e trascritti di CLU ⁸.

L'immagine mostra un'analisi WB eseguita con un anticorpo anti-CLU su lisato di cellule HEK-293 trattate con un inibitore del proteasoma (MG132). psCLU corrisponde al precursore glicosilato non ancora processato dalle endopeptidasi. La traduzione ha inizio a partire dall'AUG presente sull'esone 2 e tutti i trascritti annotati come RefSeq in NCBI possono dare origine a questo prodotto proteico (CLU 1, CLU 2 e CLU 3). Tale proteina è localizzata nel RE e nel Golgi e in WB è identificata come una banda dal peso di 60-80 kDa. Quando il precursore psCLU subisce il taglio proteolitico tra gli aa 227 e 228 si generano le due catene α e β che in condizioni riducenti sono visualizzate in WB come un'unica banda, denominata sCLU. Questa è la forma pronta per la secrezione, è glicosilata e localizza nel Golgi e nelle vescicole secretorie. CLU₁₋₄₄₉ è prodotta solo in particolari condizioni di stress della cellula a partire dall'AUG presente sull'esone 2. Anche in questo caso tutti i trascritti annotati in NCBI come RefSeq possono dare origine a questo prodotto proteico. Rispetto a psCLU, la forma CLU₁₋₄₄₉ non viene glicosilata, è localizzata presumibilmente nel citoplasma e in WB si identifica con una banda dal peso molecolare di 50 kDa. CLU₂₁₋₄₄₉ è prodotta a partire da un sito d'inizio traduzione non canonico posto sull'esone 2 e tutti i trascritti annotati come RefSeq in NCBI possono dare origine a questo prodotto proteico. CLU₂₁₋₄₄₉ non è glicosilata e ha una localizzazione citosolica. In WB è identificata come una banda dal peso molecolare di 50 kDa e per questo risulta indistinguibile dalla forma CLU₁₋₄₄₉. CLU₃₄₋₄₄₉ è prodotta a partire dall'AUG presente sull'esone 3 e può avere origine, oltre che dai trascritti annotati in NCBI come RefSeq anche dalla variante di Leskov. Questa forma non glicosilata, che localizza nel citoplasma, è identificata in WB come una banda dal peso molecolare di 45 kDa.

1.5 LA STRUTTURA

Come precedentemente accennato, nonostante molti ricercatori abbiano tentato di ottenere cristalli della proteina, ad oggi non sono disponibili dati cristallografici di CLU. Data la capacità di CLU di legare un'ampia varietà di molecole *in vitro*, è probabile che vi siano uno o più siti di legame dinamici privi di una struttura terziaria rigida e che questo ne renda difficile la cristallizzazione. Le informazioni disponibili riguardo alla struttura secondaria e terziaria derivano da studi computazionali per mezzo di programmi quali PONDR (Predictor of Natural Protein Disorder)⁴¹ e COIL⁴². Secondo il modello proposto per la biogenesi di

1. Introduzione

CLU la formazione dei ponti disolfuro avverrebbe prima del taglio proteolitico perciò si è propensi a credere che le due catene β e α si associno con un andamento antiparallelo. La regione che contiene le cisteine coinvolte nella formazione dei ponti disolfuro sarebbe strutturalmente organizzata, a differenza della regione che comprende il sito di taglio tra le catene che risulterebbe invece essere priva di ordine. Si ipotizza la presenza di tre α eliche anfipatiche: due poste alle estremità opposte della catena α e una al C-terminale della catena β . L'analisi della composizione amminoacidica rileva due regioni, una sulla catena β e una sulla catena α , con un arricchimento in amminoacidi tipici delle strutture superavvolte (coiled-coil) quali leucina, valina e prolina. Si suppone che tali regioni siano coinvolte nella formazione di due α eliche in grado di organizzarsi in un motivo coiled-coil (Fig.5)^{15,43,44}.

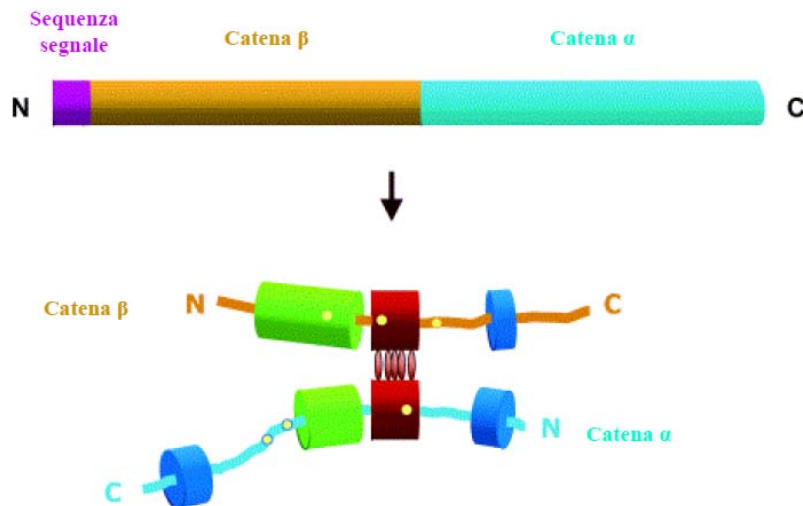


Fig.5 Rappresentazione della struttura di CLU secreta¹⁵.

Il peptide segnale (magenta) di 22 aa all'N-terminale viene tagliato contemporaneamente alla traduzione della proteina, successivamente si ha il secondo taglio proteolitico tra gli aa 227 e 228 con la conseguente formazione delle catene β (arancione) e α (azzurro). Nella proteina matura le due catene sono unite in senso parallelo da 5 ponti disolfuro (ellissi rosse). L'analisi bioinformatica ipotizza la presenza di due regioni organizzate secondo un motivo coiled-coil (cilindri verdi) e di tre α eliche anfipatiche (cilindri blu). I siti di glicosilazione sono raffigurati come puntini gialli (modificata da Jones et al. 2002¹⁵).

1.6 FUNZIONE DI CLU

CLU, una volta completato il processo di maturazione, interagisce con partner molecolari molto diversi tra loro come i lipidi, le proteine amiloidi, i componenti del complesso di attacco alla membrana oltre che alcuni chemioterapici, quali il taxolo^{30,45-47}. Nel passato molto spesso la scoperta di un nuovo ligando di CLU era accompagnata da una proposta di nuova

funzione associata al ligando in questione. Ad esempio, quando fu scoperto che CLU era in grado di legare le IgG era stato supposto un suo possibile coinvolgimento nell'associazione di queste proteine⁴⁸. Non è logico pensare che una proteina possa avere funzioni così disparate in base al ligando in questione, mentre un'ipotesi più ragionevole è che molte di queste interazioni siano l'effetto di una singola proprietà di fondo basata sulla sua funzione primaria⁴³. Il primo indizio di questa funzione primaria deriva dallo studio del suo promotore quando è stata trovata la sequenza CLE a cui si lega il fattore trascrizionale HSF1¹⁴. L'induzione di CLU osservata in seguito a shock termico ha fatto supporre che potesse rientrare nella categoria delle small Heat Shock Protein (sHSP)⁴³. Poon e colleghi dimostrarono che, a concentrazioni fisiologiche, CLU agisce da chaperone molecolare inibendo la precipitazione di proteine indotta da stress termici e/o agenti denaturanti⁴⁹. CLU si comporterebbe da sHSP non partecipando alla rinaturazione diretta delle proteine ma, legandosi ad esse, creerebbe una sorta di serbatoio refolding-competente dal quale attingerebbero chaperone ATP-dipendenti, come HSP 70, per promuovere la corretta rinaturazione delle proteine coinvolte⁵⁰. Nonostante la presenza di un motivo che lega nucleotidi, CLU esercita la sua funzione di chaperone in maniera ATP-indipendente e coopera con altri chaperone ATP-dipendenti per facilitare la stabilizzazione e il refolding di proteine. Il legame tra CLU e la maggior parte dei ligandi avviene attraverso le sue regioni idrofobiche e le porzioni idrofobiche esposte al solvente delle proteine non correttamente ripiegate⁵⁰. CLU, come le altre HSP di mammifero, ha la capacità di formare, in soluzione, aggregati eterogenei ad alto peso molecolare, e fattori come il pH, perturbano l'equilibrio tra la forma aggregata e l'eterodimero attivo. La forma eterodimerica della molecola sarebbe favorita a pH moderatamente acidi (circa 5.5) e questo sembra essere correlato ad un incremento delle superfici idrofobiche di CLU, accompagnato da un'aumentata capacità di legame nei confronti di proteine parzialmente denaturate e da una maggior efficienza nell'inibirne la precipitazione⁵¹. *In vitro* sono stati generati dei complessi tra CLU ed alcune sue proteine target note tra cui fibrinogeno, glutatione-S-transferasi e citrato sintasi, ed è stato dimostrato come il rapporto stechiometrico CLU:proteina target sia pari a 1:2⁵². Per quanto riguarda lo specifico meccanismo d'azione di CLU, la forma eterodimerica catturerebbe proteine bersaglio parzialmente denaturate durante la sua attività di chaperone per poi aggregarsi nuovamente in un complesso costituito da più subunità eterodimeriche di CLU-proteina target (Fig.6)⁵⁰. Il meccanismo proposto non richiederebbe eccessivi cambiamenti conformazionali di CLU e nemmeno dispendio di energia. CLU agirebbe come chaperone preferendo stati

intermedi a lunga vita, lentamente aggreganti, di proteine indirizzate su di una via di unfolding irreversibile alle quali si complessa per prevenirne la precipitazione. Ne consegue che l'efficienza di chaperone dipende sia da fattori conformazionali sia cinetici⁵³⁻⁵⁵.

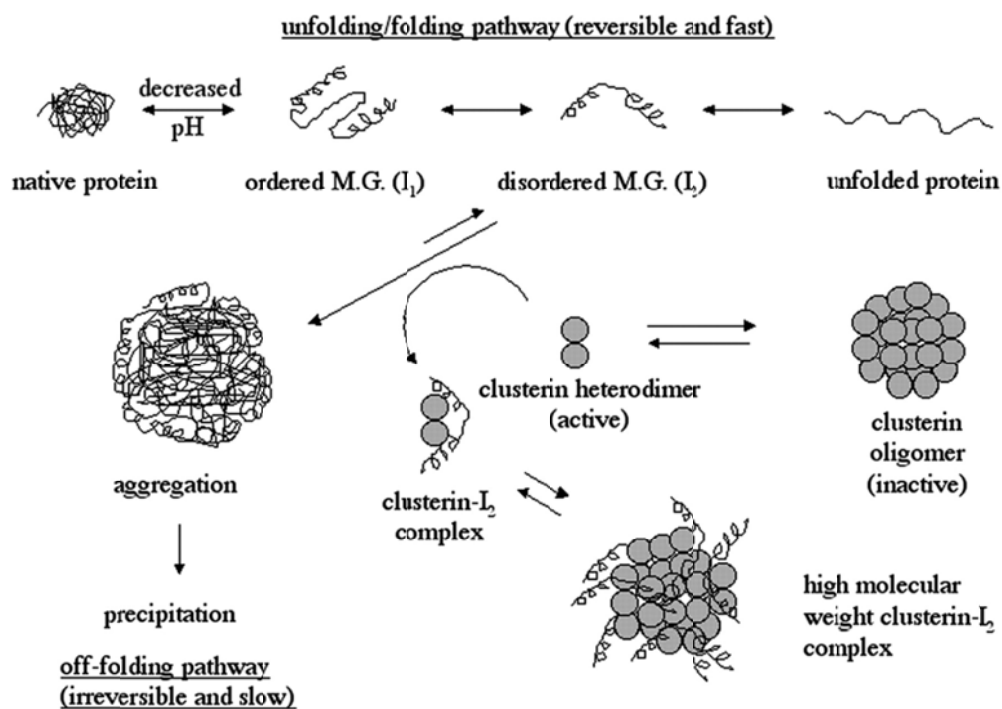


Fig.6 Rappresentazione schematica del possibile meccanismo d'azione di CLU⁵¹.

In condizioni di stress, come può essere una riduzione del pH, le proteine native vanno incontro a parziale denaturazione e adottano stati conformazionali parzialmente ripiegati (molten globe I₁ e I₂). Questi intermedi, in particolare I₂, espongono al solvente regioni idrofobiche estese che normalmente sarebbero interne alla proteina. Quando una proteina si trova nello stato I₂ può aggregare e entrare in un pathway di off-folding potenzialmente irreversibile. La forma eterodimerica di CLU, cioè quella che possiede attività di chaperone (clusterin heterodimer active), interagisce con le proteine nello stato I₂ e le sequestra in un complesso ad alto peso molecolare (high molecular weight clusterin-I₂ complex). La concentrazione dell'eterodimero di CLU incrementa quando si ha un abbassamento del pH e il meccanismo non richiede input d'energia.

Il modello d'azione proposto *in vivo* prevede che proteine extracellulari non native si leghino a CLU che media il loro ingresso nella cellula attraverso endocitosi mediata da recettori. Una volta internalizzati, questi complessi vengono degradati dagli enzimi proteolitici che si trovano all'interno dei lisosomi. Quindi, *in vivo*, il sequestro di proteine non correttamente ripiegate in grandi complessi solubili con CLU probabilmente rappresenta il primo meccanismo che interviene ad impedire la formazione di aggregati tossici o comunque patologici⁵⁶.

È stato recentemente dimostrato come lo stato di glicosilazione sia fondamentale per l'attività di chaperone, poiché la completa deglicosilazione di CLU è accompagnata da un calo dell'attività pari al 70-90%. Questo implica che le forme intracellulari, derivanti dalla traduzione di trascritti rari, eventi di splicing alternativo o siti di inizio traduzione alternativi essendo prive del peptide segnale non sono glicosilate e quindi mancano dell'attività di chaperone⁵⁷. Quale sia la funzione delle forme di CLU intracellulari non glicosilate non è al momento stato chiarito e resta una questione aperta. Forme ipoglicosilate di CLU possono trovarsi nel citoplasma in seguito a un processo di reinternalizzazione dall'ambiente extracellulare⁴⁰. Queste forme mantengono l'attività di chaperone e possono agire da sensori redox in un contesto di stress della cellula⁵⁷. Inoltre, in condizioni riducenti, il taglio proteolitico tra gli aa 227 e 228 è di importanza fondamentale per il mantenimento dell'attività di chaperone⁵⁷.

1.7 CLU E TUMORIGENESI

È noto che cambiamenti nell'espressione di CLU sono eventi importanti durante la progressione del cancro, ma il ruolo specifico della proteina nella tumorigenesi è tutt'ora argomento di studio e in letteratura ci sono dati contrastanti a riguardo. La sovraespressione di CLU è stata trovata nel tumore dell'ovaio⁵⁸, del fegato^{59,60}, del rene^{61,62}, nel melanoma⁶³, nel cancro della vescica⁶⁴ e della mammella⁶⁵. D'altra parte altri autori osservano una down-regolazione di CLU nel tumore del pancreas⁶⁶, nel neuroblastoma⁶⁷, nel cancro della pelle⁶⁸ e dell'esofago⁶⁹.

Si trova discrepanza nei dati riportati in letteratura non solo confrontando tumori di diversa natura, ma anche analizzando lo stesso tipo di tumore. I casi del tumore del colon⁷⁰ e del polmone^{71,72} ne sono un esempio, ma la situazione più controversa riguarda il ruolo di CLU nella progressione del tumore della prostata.

1.7.1 IL TUMORE DELLA PROSTATA

Il tumore della prostata (PCa) è una patologia in costante aumento in particolar modo nelle nazioni progredite. Per l'Italia le stime indicano un'incidenza al 2013 pari a 35000 nuovi casi ogni anno, mentre i dati relativi ai decessi indicano che nel 2012 si sono verificati 7260 decessi (Istituto Nazionale della sanità ed Associazione Italiana Registro Tumori) con un rischio di morte pari all'8.6%. I fattori che possono influenzare l'insorgere della malattia sono

uno stato di infiammazione intensa, stress ossidativo intenso, una disregolazione ormonale, le abitudini alimentari, la razza e l'età avanzata.

Il sistema di riferimento internazionale utilizzato per definire il grado istologico del tumore, ovvero la differenza istologica rispetto a un tessuto normale, è la classificazione secondo Gleason⁷³. La scala comprende cinque gradi principali, numerati da 1 a 5, che si riferiscono a profili istologici ben precisi (Fig.7). Procedendo dal grado 1 verso il grado 5 il tumore risulta essere sempre più indifferenziato e invasivo. Questi gradi vengono assegnati sia al profilo istologico primario, ossia il più comune, sia a quello secondario, il secondo più diffuso. Dalla somme dei gradi assegnati ai due profili si ottiene il punteggio complessivo, il cui valore è compreso tra 2 e 10. Secondo la scala Gleason più basso è il punteggio, più basso è il grado del tumore. Un basso grading (da 2 a 4) è associato a tumori con crescita lenta con poca tendenza a diffondere, mentre un grading alto (superiore a 8) è tipico dei tumori molto aggressivi.

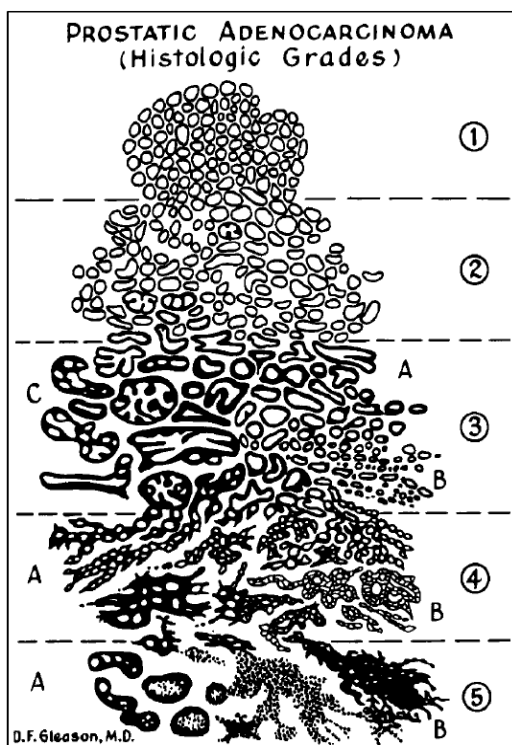


Fig.7 Classificazione istologica del tumore prostatico⁷⁴.

I profili istologici suddivisi per livello secondo la classificazione di Gleason:

Gleason 1 = Tumore nodulare con bordi lisci e ben definiti. Le ghiandole, rotonde od ovali, sono isolate e separate. Non si osserva l'invasione dello stroma.

Gleason 2 = Tumore dai bordi non ben definiti come nel grado 1. Le ghiandole, da rotonde ad ovali, sono isolate e separate con dimensioni e forma variabili. La capacità di invasione dello stroma è limitata.

Gleason 3 = Tumore con margini di infiltrazione definiti. Le ghiandole sono separate con dimensione e forma variabile, allungata e ritorta. Talvolta l'epitelio risulta cribriforme e papillare, senza necrosi. Si osserva un'espansione irregolare nello stroma.

Gleason 4 = Tumore irregolarmente infiltrante. Le ghiandole, di dimensioni variabili, sono fuse tra loro creando masse, file e catene. Si osserva una diffusa invasione dello stroma.

Gleason 5 = Tumore con bordi lisci, di forma arrotondata e cilindrica. Le masse tumorali sono capillari o cribriformi con necrosi centrale. Le ghiandole sono poche e di piccole dimensioni. Si osserva invasione dello stroma.

La stadiazione patologica, ossia l'estensione intra- ed extra- ghiandolare del tumore, si basa sulla refertazione dell'intera prostata dopo asportazione chirurgica. Il sistema internazionale di stadiazione di un tumore, TNM, considera tre parametri:

- il volume del tumore e l'estensione locale (T);
- l'interessamento di linfonodi loco-regionali (N);
- l'esistenza di metastasi a distanza (M).

Il PCa è spesso multifocale con un'evoluzione largamente imprevedibile. Non sempre infatti la proliferazione organo confinata e la formazione di metastasi si verificano consecutivamente e progressivamente in relazione alle dimensioni del tumore, ma possono essere indipendenti una dall'altra. Questa tesi dell'imprevedibilità si basa sulla peculiare caratteristica del PCa di presentarsi spesso in forma latente. Si ritiene che la maggior parte dei tumori allo stato latente abbia un comportamento biologicamente poco aggressivo e che solo una ristretta casistica possa progredire verso la forma invasiva. Ad oggi, le neoplasie dal comportamento aggressivo non sono distinguibili né morfologicamente né mediante test clinici, dalle neoplasie indolenti. Da un punto di vista istologico la forma più comune è l'adenocarcinoma (95%) che si sviluppa negli acini prostatici della prostata caudale. Da questa regione il tumore si può estendere in tempi successivi ai tessuti periprostatici, alle vescichette seminali, agli ureteri e all'uretra. Il PCa può propagarsi anche per via linfatica, prima nei linfonodi regionali e successivamente in quelli extra-regionali. Le metastasi per via ematica avvengono successivamente al coinvolgimento linfonodale e si osservano con massima frequenza a livello scheletrico, in particolare nelle vertebre lombari e nelle ossa pelviche. Sempre per via ematica il PCa può metastatizzare ai polmoni, al fegato e al surrene.

Il PCa è dipendente dagli androgeni per quanto riguarda lo sviluppo, la crescita e la sopravvivenza⁷⁵. L'enzima 5- α -riduttasi presente sulla membrana plasmatica delle cellule prostatiche epiteliali, è in grado di convertire il testosterone in diidrotestosterone (DHT)⁷⁶. Il DHT, una volta entrato nella cellula si associa al recettore per gli androgeni (AR) consentendone la traslocazione al nucleo. L'AR lega il DNA e promuove la trascrizione di geni coinvolti nel ciclo cellulare; in particolare l'attivazione dell'AR è fondamentale per la progressione cellulare dalla fase G1 alla fase S⁷⁷. La terapia di deprivazione degli androgeni effettuata mediante castrazione chimica o chirurgica, è la prima terapia che viene adottata per pazienti che presentano metastasi. Essa determina un significativo decremento del volume dei tumori primari e delle metastasi nell'80% dei pazienti trattati, almeno in un primo momento. Purtroppo, dopo un periodo di risposta alla terapia, lesioni androgeno indipendenti

possono svilupparsi e progredire nonostante i bassi livelli di androgeni circolanti. Tali lesioni sono definite tumori della prostata resistenti alla castrazione (CRPCa) e i pazienti che le manifestano sono refrattari alla terapia ormonale, alla radioterapia e alla chemioterapia.

1.7.2 INSORGENZA E PROGRESSIONE DEL TUMORE DELLA PROSTATA

Il PCa è un malattia complessa, multifattoriale ed eterogenea determinata sia da fattori genetici sia ambientali. A differenza di altre neoplasie, come il tumore del colon, per il PCa non sono ancora state definite con esattezza le fasi e i geni coinvolti nella progressione verso la malignità.

L'inflammatione intraprostata si riscontra con alta frequenza nella prostata adulta e si è ipotizzata un'associazione tra l'inflammatione cronica e l'insorgenza del PCa⁷⁸.

A sostegno di quest'ipotesi, infiltrati infiammatori sono spesso ritrovati dai patologi in biopsie eseguite in seguito a alti livelli di PSA⁷⁹, ad anomalie dell'esame dito rettale⁷⁹, a prostatectomie radicali⁸⁰ e in tessuti asportati per iperplasia prostatica benigna⁸¹.

Inoltre, un recente studio condotto su 191 pazienti ha evidenziato come l'inflammatione cronica nei tessuti benigni in biopsie sia predittiva di un rischio più elevato di diagnosi di PCa, in particolare con una diagnosi di alto grado (Gleason score 7-10)⁸².

Secondo questa teoria, i meccanismi molecolari sottesi all'insorgenza del tumore prevedono l'intervento sia del sistema immunitario innato sia di quello adattativo. Infiltrazioni di linfociti, macrofagi e neutrofili sono richiamati nella prostata come risposta a lesioni da patogeni, malattie autoimmuni, tossine derivate dalla dieta, reflusso urinario e da carcinogeni. I fagociti attivati rilasciano nel luogo della lesione specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (come superossido, perossido di idrogeno e ossido nitrico) capaci di provocare danno al DNA. Le cellule danneggiate vanno incontro a morte, innescando un processo di rigenerazione per cui tali cellule vengono rimpiazzate da quelle nuove grazie alla divisione cellulare che ha origine dalle cellule progenitrici residenti e/o da cellule staminali. La manifestazione morfologica di questa lesione è l'atrofia infiammatoria proliferativa (PIA) ed è considerata il primo cambiamento verso il PCa (Fig.8a). La manifestazione biologica consiste in un incremento della proliferazione e in un aumento delle cellule epiteliali con fenotipo intermedio tra le cellule basali e le luminali. Le cellule all'interno delle lesioni PIA sono soggette a un forte stress ossidativo, in risposta al quale generalmente si osserva in cellule normali una up-regolazione degli enzimi detossificanti di fase II come il glutathione

S-transferasi P1, GSTP1. L'espressione di GSTP1 però è frequentemente persa nella PIA a causa dell'ipermetilazione delle isole CpG del gene, lasciando il DNA cellulare vulnerabile ai composti ossidanti e di conseguenza si possono accumulare mutazioni somatiche⁸³. La manifestazione morfologica dell'accumulo di queste alterazioni è la neoplasia prostatica intraepiteliale (PIN) (Fig.8b). Il successivo accumulo di alterazioni somatiche porta da una PIN di basso grado a una PIN di alto grado prima (Fig.8c) e al carcinoma invasivo poi (Fig.8d).

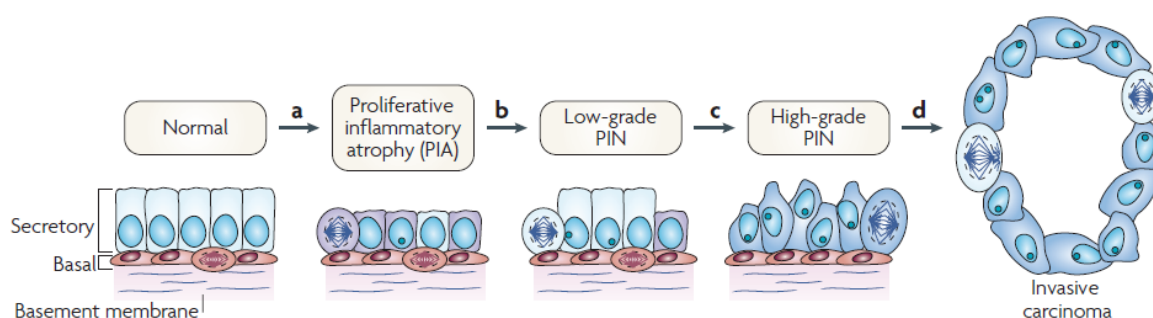


Fig.8 Modello della progressione tumorale⁸⁴.

a) L'insorgenza della PIA è caratterizzata da infiltrazioni di linfociti, macrofagi e neutrofili causate da infezioni croniche, fattori legati alla dieta e/o malattie autoimmuni. I fagociti rilasciano specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto che causano danno al DNA. **b)** L'ambiente fortemente ossidante unito alla down-regolazione degli enzimi detossificanti di fase II sono le cause che determinano il passaggio dalla PIA alla PIN. **c)** Il passaggio da una PIN di basso grado a una di alto grado è caratterizzato dall'accumulo di mutazioni dovute all'instabilità genetica. **d)** La continua proliferazione delle cellule luminali geneticamente instabili e il successivo accumulo di modificazioni geniche determinano l'insorgenza del carcinoma invasivo.

Un numero sempre più consistente di evidenze sperimentali hanno messo in luce come il cross-talk tra stroma ed epitelio sia un punto chiave per la progressione e il processo di invasività del tumore⁸⁵. Sia durante il normale sviluppo della prostata che nell'organo adulto, le cellule stromali interagiscono con le cellule epiteliali controllandone la crescita, il differenziamento e la morte. Quando le cellule epiteliali acquisiscono un fenotipo tumorale rilasciano nel microambiente una serie di fattori di crescita in grado di influenzare il metabolismo dei fibroblasti che si attivano diventando fibroblasti carcinoma-associati (CAFs). A loro volta, i CAFs rilasciano nel microambiente una serie di molecole che promuovono il rimodellamento della matrice extracellulare (EMC), la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la transizione epitelio-mesenchimale (EMT)⁸⁶. I CAFs rilasciano nel microambiente fattori pro-migratori come la tenascina, glicoproteina con proprietà anti-adesive in grado di rimodellare l'EMC. Inoltre, rilasciano serina proteasi, come l'urochinasi attivatrice del

1. Introduzione

plasminogeno (uPA) e metallo proteasi (MMP), come MMP-2 e MMP-9 capaci di degradare la matrice extracellulare.

Cunha e collaboratori hanno dimostrato, con esperimenti *in vivo*, come la segnalazione CAFs sia indispensabile nella conversione di una popolazione di cellule epiteliali prostatiche normali in tumorigeniche. È stato proposto che la presenza di CAFs sia correlata con l'inizio della fase di invasione e che i CAFs contribuiscano alla crescita e alla progressione tumorale⁸⁷.

1.7.3 CLU E PCa

Nel PCa l'espressione di CLU è alterata, ma come precedentemente accennato, il suo ruolo nella progressione della malattia è oggetto di dibattito. Alcuni autori ritengono che sia sovraespressa in particolar modo nella fase di indipendenza da androgeni⁸⁸ e che i livelli di espressione correlino con il grado di differenziamento del tumore⁸⁹, mentre altri che sia down-regolata⁹⁰⁻⁹³.

Studi di ibridazione genomica comparativa hanno evidenziato come nel PCa vi siano alterazioni geniche ricorrenti e tra queste, una frequente è la delezione del braccio corto del cromosoma 8^{94,95} che coinvolge anche il locus genico di CLU⁹⁶. Inoltre, consultando il database del sito web Oncomine (www.oncomine.org), in cui è possibile confrontare i livelli di espressione genica di differenti studi di microarray, Sala e colleghi hanno evidenziato come, in 7 esperimenti indipendenti, CLU sia down-regolata nei PCa primari rispetto alle cellule normali⁹⁷. Le differenze tra tessuto prostatico normale e tumorale non riguardano solo i livelli di espressione di CLU, ma anche la sua distribuzione. Infatti, nella prostata normale essa è localizzata sia nelle cellule stromali sia in quelle epiteliali, con un'espressione maggiore in quest'ultime. Al contrario, nei PCa primari l'espressione di CLU è prevalentemente confinata al compartimento stromale, mentre nelle cellule epiteliali è generalmente assente o presente a bassi livelli e localizzata nel citosol^{98,99}. Si può speculare che CLU prodotta dalle cellule stromali e rilasciata nell'ambiente extracellulare sia coinvolta nell'involutione del compartimento stromale che si osserva nella progressione del PCa. A sostegno di tale ipotesi, alti livelli di CLU nel compartimento stromale sono associati alla ricomparsa della malattia dopo prostatectomia radicale nei pazienti con Gleason score intermedio¹⁰⁰. Al contrario, però, July e collaboratori mostrano come l'espressione di CLU sia limitata al compartimento epiteliale e come la sua espressione sia significativamente più alta

in pazienti sottoposti a terapia ormonale, suggerendone un ruolo nell'insorgenza della fase refrattaria della malattia¹⁰¹. La presenza di più trascritti espressi a differenti livelli, in differenti popolazioni di cellule può spiegare, almeno in parte, la discrepanza dei dati che si trovano in letteratura. Inoltre, non si può escludere la possibilità che il ruolo svolto da CLU potrebbe avere effetti diversi sulla cellula in base allo stadio del PCa. Si può ipotizzare che possa agire da modulatore negativo della progressione tumorale nelle fasi precoci della trasformazione, in quanto la sua funzione di chaperone favorisce il mantenimento dell'omeostasi. Nelle fasi tardive della malattia, in cui l'omeostasi cellulare è già fortemente compromessa, CLU potrebbe agire da modulatore positivo e la sua sovraespressione potrebbe favorire la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali.

Al fine di studiare il ruolo svolto da CLU nelle prime fasi del tumore è stato generato un modello murino transgenico derivante dall'incrocio di animali "Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate" (TRAMP) con animali deleti nel gene di CLU (*clu* KO). I topi TRAMP sono animali ingegnerizzati in modo che l'espressione degli antigeni T/t del virus SV40 sia sotto il controllo del promotore della probasina, una proteina la cui attività dipende dagli androgeni circolanti. L'espressione degli antigeni virali causa l'abrogazione della funzione di alcune proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare quali p53, la proteina del retinoblastoma (pRb) e la proteina fosfatasi 2A (PP2A). Con il sopraggiungere della pubertà, circa alla dodicesima settimana di vita, i livelli di androgeni circolanti aumentano e solo i roditori maschi sviluppano microscopiche lesioni tumorali a livello della prostata nel 100% dei casi. Queste microlesioni evolvono in carcinoma invasivo ben differenziato prima, e indifferenziato poi, fino alla formazione di metastasi, intorno alla ventiquattresima settimana di vita. Lo sviluppo del PCa è correlato all'età e mima tutte le fasi della patologia umana, dalla PIN al tumore invasivo^{102,103}. I topi *clu* KO sono animali ingegnerizzati in modo tale che uno o entrambi gli alleli del gene CLU siano inattivi. Inizialmente si è ritenuto che l'abrogazione di uno o entrambi gli alleli non determinasse nessun difetto macroscopico eccetto una maggiore tendenza a sviluppare problemi di autoimmunità a livello cardiaco e una maggiore propensione alla tumorigenesi chimicamente indotta rispetto ad animali normali^{68,104}. Successivamente Bettuzzi e collaboratori hanno osservato, intorno alla quarantesima settimana di età, una trasformazione dell'epitelio prostatico in animali *clu* KO eterozigoti (+/-) ed omozigoti (-/-). Sono stati individuati casi di PIN sia precoce che di alto grado, oltre che casi di PCa ben differenziato¹⁰⁵. Dall'incrocio di topi TRAMP con topi *clu*

1. Introduzione

KO si ottengono animali che hanno una tendenza a sviluppare precocemente il PCa con caratteristiche di maggior aggressività. La curva di sopravvivenza a 28 settimane di vita mostra come gli animali TRAMP/*clu* KO (+/-) e TRAMP/*clu* KO (-/-) abbiano una sopravvivenza ridotta rispettivamente all'83% e al 70% se confrontati con gli animali TRAMP. Inoltre si riscontra la presenza di metastasi in siti ectopici in tempi più precoci rispetto a ciò che si osserva nei topi TRAMP. Negli animali TRAMP *clu* KO (-/-) è stato rilevato un forte segnale di Ki67, un marker di proliferazione cellulare, non solo nelle regioni interessate da lesioni tumorali, come si osserva per gli animali TRAMP, ma anche nelle porzioni di prostata non trasformate¹⁰⁵. Nel modello TRAMP/*clu* KO (-/-) rispetto agli animali TRAMP si osserva un'elevata espressione del fattore nucleare enancher della catena leggera kappa delle cellule B attivate (NF-kB), che risulta essere particolarmente espresso in quelle cellule dell'epitelio prostatico trasformato che sono positive per Ki67. Poiché l'attivazione di NF-kB promuove il rimodellamento della matrice extracellulare e l'EMT, questo potrebbe spiegare come mai gli TRAMP/*clu* KO hanno una tendenza a sviluppare precocemente metastasi in siti ectopici rispetto ad animali TRAMP.

Sulla base dei risultati riportati da alcuni gruppi di ricerca, secondo cui nelle fasi di indipendenza dagli androgeni si osserva la sovraespressione di CLU, si è adottata la tecnica del silenziamento di CLU con oligonucleotidi antisenso (ASO) per valutare un suo possibile coinvolgimento nella resistenza alla terapia nei tumori CRPCa. Gli ASO sono delle corte sequenze di DNA a singolo filamento, chimicamente modificate, capaci di appaiarsi a una regione dell'mRNA target, generando un duplex DNA/RNA che riduce i livelli sia dell'mRNA sia della proteina target.

L'oligonucleotide utilizzato in questi studi, chiamato OGX-011, si appaia a livello dell'AUG d'inizio traduzione posto sull'esone 2 e i suoi target molecolari sono quindi le varianti trascrizionali CLU 1, CLU 2 e CLU 3, ma non la variante di Leskov in quanto priva di tale esone.

Studi preclinici condotti su linee cellulari prostatiche androgeno indipendenti hanno evidenziato come la somministrazione dell'OGX-011 in associazione con chemioterapici riduca significativamente l'IC₅₀ rispetto al trattamento con il solo chemioterapico^{88,106}.

Uno studio *in vivo* con animali xenograft ha evidenziato sinergia tra l'OGX-011 e due chemioterapici, nell'inibizione della crescita del tumore¹⁰⁷. Dati i promettenti risultati, l'OGX-011 è entrato in fase di sperimentazione clinica sull'uomo e con uno studio clinico di

fase I, condotto su pazienti CRPCa, è stato dimostrato come *in vivo* inibisca l'espressione di CLU e ne è stata stabilita la dose tollerata¹⁰⁸. Successivamente, è stato condotto un trial clinico di fase II in cui pazienti CRPCa sono stati sottoposti al trattamento combinato di Custirsen (nome commerciale dell'OGX-011) con docetaxel e prednisone, due farmaci di prima linea comunemente utilizzati in combinazione nella terapia del PCa. Dal trial è emerso che la somministrazione di Custirsen, docetaxel e prednisone aumenta la sopravvivenza dei pazienti di 6.9 mesi rispetto ai soggetti trattati solo con la combinazione docetaxel e prednisone^{109,110}. Seppur promettente, la somministrazione di Custirsen in combinazione con gli altri due farmaci di prima linea non ha decretato un aumento significativo dell'aspettativa di vita una volta che il farmaco è entrato in fase III di sperimentazione (www.oncogenex.com; www.onclive.com/web-exclusives/Custirsen-Combination-Misses-Goal-in-Phase-III-mCRPC-Trial).

1.8 CLU INTRACELLULARE

Nonostante CLU sia una proteina prevalentemente extracellulare, è possibile ritrovarla all'interno della cellula dove interagisce con differenti processi e vie di segnalazione intracellulari, tra cui il processo di apoptosi e la via di segnalazione della proteina chinasi B (AKT)^{111,112}. Inoltre, sono emerse evidenze sperimentali che sottolineano un suo coinvolgimento nel signaling di NF-kB.

1.8.1 LA VIA DI SEGNALAZIONE DI NF-kB

NF-kB è una famiglia di fattori trascrizionali composta da omo- ed eterodimeri che regolano diverse funzioni della cellula quali apoptosi, proliferazione e differenziamento, oltre ad avere un ruolo fondamentale nel controllo della risposta immunitaria e dell'infiammazione.

Tutte le proteine della famiglia possiedono all'N-terminale un dominio definito Rel-Homology domain (RHD) coinvolto nella dimerizzazione e nel legame al DNA. Nell'uomo i membri della famiglia sono 5, divisi in due classi in base alla presenza di un dominio di transattivazione (Trans-activator domain, TAD) o di un dominio inibitorio caratterizzato da ripetizioni di anchirina (Trans-repression domain, TRD). Appartengono alla prima classe NF-kB1 (denominato anche p105→p50) e NF-kB2 (denominato anche p100→p52), mentre appartengono alla seconda classe RelA (più comunemente definito p65), RelB e c-Rel. Le varie proteine della famiglia si associano in dimeri che variano in base alla

1. Introduzione

tipologia cellulare. Tra tutte le possibili combinazioni, l'eterodimero p65/p50 è quello con espressione ubiquitaria e che si trova con maggiore frequenza. L'attività di NF- κ B è regolata attraverso l'interazione con una famiglia di molecole inibitorie, chiamate inibitori di κ B (I κ B), che ne modulano la funzione sequestrando il fattore di trascrizione nel citosol in forma inattiva. Nell'uomo la famiglia conta 7 membri, tutti caratterizzati dalla presenza di ripetizioni di anchirina che schermano i segnali di localizzazione nucleare di NF- κ B.

Le I κ B, a loro volta, sono regolate dall'azione di chinasi denominate I κ B chinasi (IKK), che le fosforilano su specifiche serine. La fosforilazione è un segnale che ne determina la poliubiquitinazione e la successiva degradazione a livello del proteasoma. Una volta eliminato l'inibitore, NF- κ B è in grado di traslocare nel nucleo, ma sono necessarie fosforilazioni dirette sul fattore di trascrizione affinché questo possa legare il DNA e promuovere la trascrizione di geni bersaglio.

Nella via di segnalazione canonica, ligandi extracellulari legano i propri recettori, che attraverso una serie di proteine adattatrici, determinano la fosforilazione del complesso IKK. Esso è formato da due subunità catalitiche, IKK α e IKK β , e da una subunità con funzione di scaffold, il modulatore essenziale di NF- κ B (NEMO) denominato anche IKK γ . La fosforilazione del complesso IKK determina, a sua volta, la fosforilazione e la successiva degradazione di I κ B α . L'eterodimero p65/p50, libero dall'inibitore, è fosforilato dal complesso IKK sui residui S276, S468 e S536 prima di poter traslocare nel nucleo e promuovere la trascrizione dei suoi geni target (Fig.9, pannello sinistra).

Oltre alla via di attivazione canonica appena descritta è possibile una seconda via definita non canonica in cui il segnale converge sulla chinasi induttrice di NF- κ B (NIK) che sua volta attiva l'omodimero IKK α . Quando questo è attivo ha come bersaglio il dimero p100/RelB, la cui fosforilazione provoca la degradazione del dominio inibitorio di p100 e la successiva traslocazione di p52/RelB nel nucleo¹¹³(Fig.9, pannello destra).

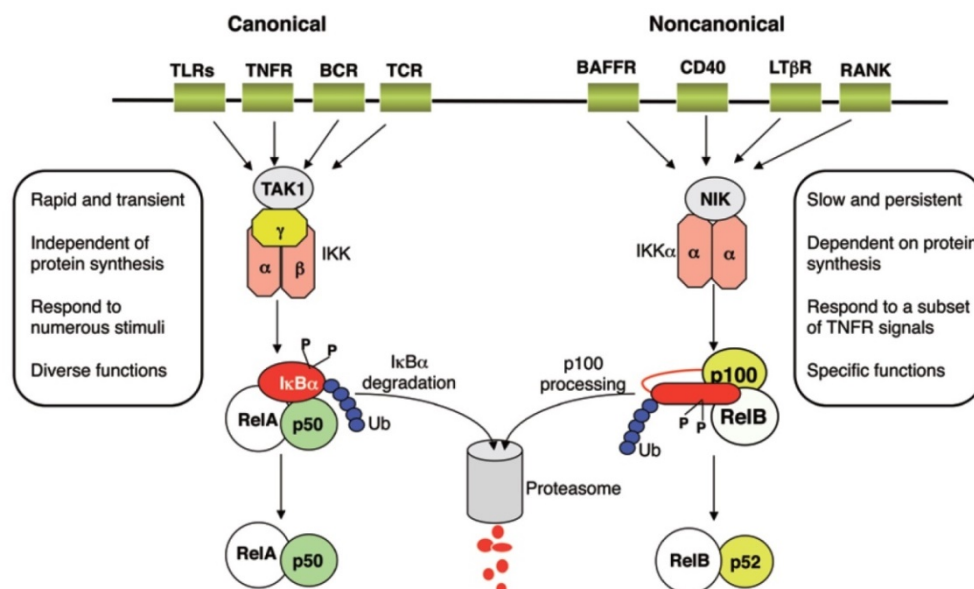


Fig. 9 La via di segnalazione NF- κ B¹¹⁴.

Nel pathway di attivazione canonico ligandi extracellulari come il lipopolisaccaride di membrana (LPS), il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) o l'interleuchina (IL-1), legano il proprio recettore che attraverso una serie di proteine adattatrici e proteine chinasi attiva il complesso IKK. Questo complesso a sua volta fosforila I κ B α , determinandone la successiva ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma. Il dimero RelA/p50 trasloca nel nucleo e promuove la trascrizione di geni target. Nel pathway non canonico ligandi extracellulari si legano a recettori, come il recettore del fattore attivante le cellule B (BAFFR), il recettore della molecola CD40 (CD40), il recettore attivato da NF- κ B (RANK) o il recettore per la β -linfotossina (LT β R), che a loro volta attivano il complesso IKK α /IKK α per mezzo della chinasi NIK. IKK α può fosforilare p100, determinandone la successiva poliubiquitinazione e processamento in p52. L'eterodimero p52/RelB può traslocare al nucleo e trascrivere i geni target.

Il pathway NF- κ B è costitutivamente attivo in molti tipi di tumori, dalle neoplasie ematologiche ai tumori solidi come il PCa, dove si ritiene contribuisca allo sviluppo della malattia regolando geni che inibiscono l'apoptosi e favoriscono la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la formazione di metastasi¹¹⁵⁻¹¹⁸.

A differenza di quanto si potrebbe pensare, mutazioni a carico dei membri della famiglia NF- κ B o di altri componenti del pathway sono rare, in particolare nei tumori solidi. Le alterazioni che determinano l'attivazione costitutiva di NF- κ B sono principalmente mutazioni attivanti a carico di oncogeni e regolatori positivi del pathway oppure mutazioni che inattivano i regolatori negativi della via¹¹⁹. Questo spiega perché nel PCa è difficile trovare p53 mutata anche se, in particolare nella fase di indipendenza dagli androgeni, si osservano alti livelli di mRNA e di proteina¹²⁰. Nel PCa l'attivazione costitutiva di NF- κ B è un evento cruciale nella progressione del tumore dallo stadio primario allo stadio CRPCa¹²¹. In un modello murino di tumore prostatico è stato osservato come l'attivazione costitutiva della via,

1. Introduzione

ottenuta mediante delezione di I κ B α , aumenti il tasso di progressione del tumore rispetto ad animali in cui la via non è alterata¹²². I livelli di p65 nucleare correlano con l'espressione di geni i cui prodotti sono importanti per l'invasività del tumore¹²³⁻¹²⁶. Tra i geni trascritti da p65 attivata si trovano la catepsina B (CTSB)¹²⁷, uPA¹²⁸ e MMP-9¹²⁹, appartenenti tutti al pathway di degradazione della matrice extracellulare.

CTSB è una cisteina proteasi che in condizioni fisiologiche agisce come proteasi lisosomiale ed è rilasciata nell'ambiente extracellulare in seguito a esocitosi. Nelle lesioni tumorali, oltre a essere sovraespressa, ha una localizzazione differente e si trova nel citoplasma periferico. Essa viene rilasciata nell'ambiente cellulare come pro-proteina e la sua attivazione determina una cascata proteolitica che inizia con l'attivazione di uPA, una serina proteasi coinvolta nei processi di adesione, migrazione e rimodellamento tissutale. Una volta attivata da CTSB, il suo substrato principale è il plasminogeno, la forma inattiva della plasmina. Una volta che il plasminogeno è convertito nella forma attiva innesca una cascata proteolitica che porta all'attivazione delle MMP, tra cui anche la MMP-9. Questa è una peptidasi zinco-dipendente, sintetizzata e secreta come pro-enzima e la sua attivazione avviene in seguito al taglio proteolitico ad opera di uPA. Il dimero attivo che si viene a formare lega e taglia il collagene di tipo IV e l'elastina, promuovendo il rimodellamento della matrice extracellulare¹³⁰.

1.8.2 CLU E NF- κ B

La prima evidenza sperimentale di un coinvolgimento di CLU nella regolazione del pathway di NF- κ B risale al 2003 quando Santilli e collaboratori osservano come la sovraespressione di CLU nelle cellule di neuroblastoma riduca significativamente l'attività di NF- κ B. Il meccanismo d'azione da loro proposto prevede la stabilizzazione indiretta di I κ B α e I κ B β , con conseguente riduzione dell'attività di NF- κ B⁶⁷. L'azione di CLU sarebbe mediata dalla HSP 60, un chaperone overespresso nel tumore, la cui forma citosolica inibisce l'apoptosi attivando la via di NF- κ B. Secondo gli autori il legame tra CLU e HSP 60 avrebbe un ruolo antagonista nella regolazione del pathway di NF- κ B¹¹². Studi successivi, hanno però dimostrato un coinvolgimento più diretto di CLU nella regolazione della via, in particolare hanno provato l'interazione fisica tra CLU e la forma fosforilata dell'inibitore I κ B α . Secondo gli autori una regione di CLU sarebbe omologa a β -TrCP, l'ubiquitina ligasi responsabile della degradazione di I κ B α . Essi ipotizzano che l'interazione tra CLU e I κ B α fosforilato ostacoli il legame di β -TrCP all'inibitore, impedendone quindi l'ubiquitinazione e la

successiva degradazione^{131,132}. Altri autori, utilizzando modelli sperimentali diversi, quali cellule primarie epiteliali di rene, linee cellulari di tumore prostatico e di neuroblastoma, dimostrano come vi sia una correlazione inversa tra l'espressione di CLU e l'espressione/attività di NF-kB^{105,133,134}. Lo stesso risultato è stato ottenuto *in vivo* sia utilizzando modelli murini di neuroblastoma e tumore della prostata, sia analizzando biopsie di campioni umani di tumore del polmone^{105,134,135}.

A contrario di quanto riportato finora, altri autori affermano che vi sia una correlazione diretta tra i livelli di CLU e l'attività di NF-kB. Essi sostengono che elevati livelli di CLU intracellulare promuovano la sopravvivenza delle cellule tumorali attivando il pathway canonico di NF-kB. CLU farebbe parte di un complesso multimerico insieme a p65, IκBα e la proteina 1 contenente il dominio CMM (COMMD1). Quest'ultimo è un regolatore negativo della via, la cui funzione è quella di stabilizzare IκBα. Il ruolo di CLU nel complesso sarebbe quello di promuovere l'ubiquitinazione e la degradazione sia di COMMD1, sia di IκBα, con conseguente attivazione della via canonica del pathway e trascrizione di geni capaci di promuovere la sopravvivenza della cellula¹³⁶.

Nonostante sia evidente che la forma citosolica di CLU interagisca con la via di segnalazione di NF-kB, la natura di tale interazione non è ancora stata del tutto chiarita.

2. Scopo

Dalla sua scoperta fino ad oggi, CLU è risultata essere una proteina enigmatica, la cui funzione non è ancora stata compresa appieno. Nonostante siano passati 30 anni dalla sua identificazione ci sono ancora carenze di base sulla conoscenza dei meccanismi di regolazione dell'espressione del gene, della struttura della proteina e della funzione svolta nel comparto intracellulare.

Il recente aggiornamento della banca dati NCBI ha identificato tre trascritti come RefSeq, ma ancora rimane da chiarire la loro funzione e la loro regolazione. È stato dimostrato come l'espressione di CLU sia indotta da vari agenti, tra cui farmaci epigenetici e chemioterapici, ma nessuno ha verificato come questi possano influenzare la distribuzione delle varianti trascrizionali CLU 1 e CLU 2. Un punto ancor oggi dibattuto è il ruolo di CLU nei tumori, in particolare nel PCa. Sebbene la sua espressione, sia a livello di mRNA sia di proteina, si riduca nei tumori non soggetti ad ablazione androgenica, alcuni sostengono che sia sovraespressa, in particolare in tumori refrattari alla castrazione chimica. È noto che l'attivazione della via di NF-κB è un evento chiave nella progressione del PCa, in particolare nel processo di metastatizzazione. Evidenze sperimentali confermano il coinvolgimento di CLU nella modulazione del signaling di NF-κB, ma il suo ruolo non è ancora stato completamente compreso.

Date le premesse, lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di chiarire alcune ambiguità ad oggi non risolte. Il lavoro sperimentale si occupa di vari aspetti della biologia di CLU ed è articolato in tre parti, così suddivise:

- 1) espressione dei trascritti CLU 1, CLU 2 e della proteina in modelli *in vitro*;
- 2) analisi delle regioni regolatrici del gene;
- 3) interferenza della forma citosolica della proteina con il pathway di NF-κB.

Nello specifico, nella prima parte si valuterà la distribuzione delle varianti CLU 1 e CLU 2 in cellule umane normali, nei tumori solidi e in linee cellulari di linfomi non-Hodgkin. Si focalizzerà l'attenzione sul trascritto ad oggi meno conosciuto, CLU 2, e si determinerà se viene tradotto in proteina, quali forme proteiche è in grado di generare e la relativa localizzazione. Si valuterà inoltre la regolazione trascrizionale dell'espressione di CLU 1 e CLU 2, nonché i livelli di proteina prodotta, in cellule umane tumorali in seguito alla somministrazione di farmaci epigenetici, quali TSA e AZDC, e di chemioterapici, quali Doxorubicina e Rituximab.

2. *Scopo*

Nella seconda parte, verrà vagliata l'ipotesi della presenza di un'ulteriore regione regolatoria, rispetto a quella riportata in letteratura, responsabile dell'espressione CLU 2. Inoltre, si investigheranno i possibili meccanismi responsabili della regolazione epigenetica dei trascritti CLU 1 e CLU 2.

In ultimo, utilizzando un modello cellulare di tumore prostatico androgeno indipendente, verrà indagato come all'interno della cellula CLU regola il signaling di NF-kB. In particolare si valuterà come la sovraespressione e il silenziamento di CLU possano influenzare la localizzazione, l'espressione e l'attività di NF-kB, nonché l'espressione di alcuni suoi geni target coinvolti nei meccanismi di proliferazione e di metastatizzazione.

3. Materiali e metodi

3.1 CARATTERISTICHE DELLE LINEE CELLULARI E LORO MANTENIMENTO

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate differenti linee cellulari sia normali sia tumorali. Di seguito è riportato l'elenco di tutte le cellule con una breve descrizione delle caratteristiche morfologiche e delle alterazioni del profilo genico, nonché del terreno impiegato per la crescita.

WI38

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare diploide derivata da tessuto polmonare normale fetale.
Caratteristiche	Fibroblasti dalla classica morfologia fusiforme.
Mantenimento	Acquistate dall'American Tissue Culture Collection (ATCC), sono state coltivate in mezzo DMEM-high glucose.

PNT1a

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Cellule aneuploidi di prostata di un maschio caucasico di 35 anni.
Caratteristiche	Cellule epiteliali immortalizzate mediante trasfezione con un plasmide contenente il genoma di SV40. Esse mostrano il fenotipo di cellule prostatiche luminali differenziate con espressione della cheratina 8 e 18 (marcatori di cellule epiteliali ghiandolari luminali) e della vimentina.
Mantenimento	Queste cellule sono un gentile dono del Prof. N.J. Maitland (Yorkshire Cancer Center Unit, York, UK), sono state coltivate in mezzo RPMI 1640.

PC3

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare derivante da metastasi ossee di adenocarcinoma prostatico di IV grado isolate da un maschio caucasico di 62 anni.
Caratteristiche	Cellule epiteliali con morfologia allungata, caratterizzate da un fenotipo androgeno indipendente con una debole attività della fosfatasi acida e della testosterone-5- α -reduttasi. Non esprimono la proteina p53 e la proteina fosfatasi e tensina omologa (PTEN).
Mantenimento	Acquistate dall'ATCC, sono state coltivate in mezzo Ham's F12: DMEM medium (1:1).

3. Materiali e metodi

DU145

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare derivata da metastasi cerebrali di adenocarcinoma prostatico isolate da un maschio caucasico di 69 anni.
Caratteristiche	Cellule epiteliali con microvilli, desmosomi, mitocondri e apparato del Golgi ben sviluppati e lisosomi eterogenei. Sono caratterizzate da un fenotipo androgeno indipendente con una debole attività della fosfatasi acida. Non esprimono l'antigene prostatico specifico (PSA).
Mantenimento	Acquistate dall'ATCC, sono state coltivate in mezzo RPMI 1640.

BEAS2B

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare isolata da epitelio bronchiale normale.
Caratteristiche	Cellule epiteliali immortalizzate tramite infezione con ibrido adenovirus 12-SV40. Rispondono positivamente alla colorazione per le cheratine.
Mantenimento	Queste cellule sono un gentile dono del Dr. F. Luppi (Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, IT), sono state coltivate in mezzo LHC-9/RPMI.

HTB-125

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare diploide isolata da tessuto mammario normale periferico a un adenocarcinoma infiltrante dal quale ebbe poi origine la linea cellulare HTB-126.
Caratteristiche	Cellule con una morfologia fibroblasto-simile. In origine probabilmente erano mioepiteliali in quanto possiedono microfilamenti e cluster di vescicole pinocitotiche simili a quelle osservabili nel mioepitelio <i>in vivo</i> .
Mantenimento	Queste cellule sono un gentile dono del Dr. L. Bruni (Università di Parma, Parma, IT), sono state coltivate in mezzo LHC-9/RPMI.

MCF7

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare derivante da metastasi pleurali di adenocarcinoma mammario isolata da una femmina caucasica di 69 anni.
Caratteristiche	Fibroblasti dalla classica morfologia fusiforme. Esse esprimono l'oncogene WNT7B e sono inibite da TNF α .
Mantenimento	Queste cellule sono un gentile dono del Dr. F. Luppi (Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, IT), sono state coltivate in mezzo RPMI 1640.

A549

Proprietà di crescita	Cellule aderenti.
Provenienza	Linea cellulare ipotriploide ottenuta da tessuto polmonare carcinomatoso di un maschio caucasico di 58 anni.
Caratteristiche	Cellule epiteliali caratterizzate dalla capacità di sintetizzare lectina e contenenti alti livelli di acidi grassi insaturi, importanti per il mantenimento delle membrane cellulari.
Mantenimento	Queste cellule sono un gentile dono del Dr. F. Luppi (Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, IT), sono state coltivate in mezzo RPMI 1640.

Toledo

Proprietà di crescita	Cellule in sospensione.
Provenienza	Linea cellulare di linfoma non-Hodgkin ottenuta da sangue periferico di una femmina bianca.
Caratteristiche	Linfociti B con morfologia fibroblastode. Sono positive per CD10, CD19, CD20 e CD38, mentre sono negative per CD23 e CD39.
Mantenimento	Acquistate dall'ATCC, sono state coltivate in mezzo RPMI 1640.

OCI-LY 10

Proprietà di crescita	Cellule in sospensione.
Provenienza	Linfociti B isolati dal sangue di un soggetto affetto da linfoma non-Hodgkin.
Caratteristiche	Linfociti B caratterizzati da una morfologia tondeggiate.
Mantenimento	Queste cellule sono un gentile dono del Dr R. Frazzi (Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, IT), sono state coltivate in mezzo RPMI 1640.

Tutti i mezzi di coltura sono supplementati con il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Lonza, Basel, CH), 2 mM di L-glutamina (Euroclone, Milano, IT), 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL streptomycin (Euroclone, Milano, IT). Quando un mezzo di coltura è supplementato con FBS, glutamina e antibiotici, è definito completo. Tutte le linee cellulari sono coltivate a temperatura costante di 37 °C e in atmosfera controllata al 5% di CO₂. Per le linee cellulari che crescono in adesione, queste sono staccate dal supporto di crescita mediante Tripsina/EDTA 0.2 g/mL.

3.2 CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU

Per generare i cloni stabili sovraesprimenti CLU (PC3_{CLU}) è stato utilizzato il vettore d'espressione bicistronico pIRESHyg 1 (U89672, Clontech, Oxford, UK) in cui è stata precedentemente clonata la sequenza codificante di CLU a partire dall'ATG sul secondo esone (pIRES-CLUfull)¹³⁷. La proteina che ne deriva è la forma di 449 aa che in WB è visualizzata come due bande corrispondenti al precursore, psCLU (circa 60 kDa) e alla forma processata pronta per la secrezione, sCLU (circa 40 kDa). Il vettore è costruito in modo tale che a valle della cassetta d'espressione si trova il gene che codifica per l'igromicina B fosfotransferasi (Hyg^R) deputata alla resistenza all'igromicina. Questo sistema garantisce che l'espressione del gene clonato nel vettore sia sempre accompagnata dall'espressione del gene Hyg^R. Alti livelli di antibiotico permettono quindi di selezionare solo cellule che esprimono Hyg^R, e il gene d'interesse, riducendo la possibilità di falsi positivi. Il vettore pIRES-CLUfull è trasfettato in cellule PC3 con il reattivo FuGENE[®] HD (Roche, Basel, CH) e parallelamente, come controllo degli esperimenti, sono stati generati cloni stabili di controllo (PC3_{mock}) trasfettando le cellule PC3 con il solo plasmide pIRESHyg 1 in cui non è stata clonata nessuna sequenza codificante (pIRES-mock).

Per ottenere i cloni, le cellule PC3 sono state seminate alla densità di 37.5×10^4 cell/mL in dish da 100 mm e la trasfezione è stata condotta 24 ore dopo la semina. Brevemente, il mezzo DMEM privo di siero viene miscelato al reattivo di trasfezione e successivamente si aggiunge il DNA plasmidico mantenendo un rapporto 1:2.5 tra DNA e reattivo di trasfezione (2 µg di DNA ogni 5 µL di FuGENE[®] HD). Il reattivo di trasfezione è lasciato a contatto con il DNA per 45 minuti prima di aggiungere il mezzo DMEM addizionato di FBS e antibiotici. Le cellule sono incubate 18 ore con la miscela così ottenuta e allo scadere del tempo il mezzo contenente FuGENE[®] HD è sostituito con mezzo DMEM completo e fresco. La selezione delle cellule che hanno integrato stabilmente il plasmide è fatta 48 ore dopo la trasfezione, aggiungendo al mezzo di coltura 50 µg/mL di igromicina. Dopo due settimane di selezione, i singoli cloni oltre che una popolazione policlonale (PC3_{Poly CLU} e PC3_{Poly mock}) sono stati isolati e coltivati in mezzo completo addizionato con 30 µg/mL di igromicina.

3.3 TRASFEZIONE TRANSIENTE DI pIRES-CLUfull e pIRES-mock

Le cellule PC3 sono seminate alla densità di 37.5×10^4 cell/mL 24 ore prima della trasfezione, che è eseguita con gli stessi vettori impiegati per generare i cloni stabili utilizzando il FuGENE[®] HD come reattivo e il medesimo protocollo. L'efficienza di trasfezione è stata valutata trasfettando in parallelo le cellule con il plasmide d'espressione pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA), contenente la sequenza codificante (CDS) del gene Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), proteina che, quando espressa, conferisce alle cellule una fluorescenza verde. Dopo 24 e 48 ore dal termine della trasfezione, invece di procedere con la selezione antibiotica, le cellule sono state raccolte e si è proceduto con l'estrazione dell'RNA, delle proteine o con il saggio di attività di p65. La sovraespressione di CLU è stata verificata ogni volta sia a livello di mRNA sia di proteina.

3.4 TRASFEZIONE CON siRNA

Il silenziamento di CLU è stato condotto trasfettando le cellule PC3 e DU145 con un siRNA complementare a una porzione dell'esone 2 di CLU la cui sequenza è: 5'-GCAGCAGAGUCUUCAUCAU-3' (siRNA CLU) (Ambion, Austin, TX). Dato il punto d'appaiamento, il siRNA è in grado di silenziare contemporaneamente tutte le varianti trascrizionali di CLU. Il controllo negativo degli esperimenti è condotto trasfettando le stesse cellule nelle medesime condizioni con una sequenza siRNA (NC siRNA) che non appaia a nessun mRNA presente all'interno della cellula (Integrated DNA Technologies, Coraville, CA). L'efficienza di trasfezione è stata valutata trasfettando in parallelo le cellule con un siRNA CLU modificato al 5' con un piccolo fluoroforo verde. Le cellule PC3 e DU145 sono state seminate alla densità di 7.5×10^4 cell/mL e trasfettate con 100 nM di siRNA CLU o NC utilizzando il reattivo Trans-IT-TKO Transfection Reagent (Mirus Bio, Madison, WI). Brevemente, per cellule cresciute in dish da 35 mm, il reattivo di trasfezione viene miscelato al DMEM privo di siero mantenendo un rapporto 1:10 tra i due (20 µL di reattivo ogni 200 µL di DMEM privo di siero) e si incuba 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si aggiungono alla miscela di reazione 100 nM di siRNA CLU o NC e si incuba 30 minuti sempre a temperatura ambiente. 200 µL della miscela sono addizionati alle cellule coltivate in 1.8 mL di mezzo completo, ma privo di antibiotici. Le cellule sono incubate 18 ore con la miscela così ottenuta e allo scadere del tempo il mezzo contenente il reattivo di trasfezione è sostituito con mezzo DMEM completo contenente penicillina e streptomina.

3. Materiali e metodi

Terminata la trasfezione, le cellule PC3 e DU145 sono sottoposte a trattamento con TSA o AZDC-TSA (vedere di seguito per i dettagli dei trattamenti) prima di essere sottoposte al saggio di proliferazione cellulare WST-1. In alternativa, solo per le cellule PC3, si è proceduto con l'estrazione dell'RNA e delle proteine 48 e 72 ore dopo la trasfezione. L'effettivo silenziamento di CLU è stato verificato ogni volta sia a livello di mRNA sia di proteina.

3.5 TRATTAMENTI

3.5.1 FARMACI EPIGENETICI

Le cellule PC3 e DU145 sono state trattate con i farmaci epigenetici TSA e AZDC per valutare il loro effetto sull'espressione di CLU. Le cellule sono state seminate alla densità di 70×10^3 cell/mL 24 ore prima di essere trattate con TSA, AZDC o AZDC-TSA. Il trattamento TSA prevede la somministrazione del farmaco alla concentrazione di $1 \mu\text{M}$ per 24 ore, mentre il trattamento AZDC prevede la somministrazione del farmaco alla concentrazione di $10 \mu\text{M}$ per 72 ore, rinfrescando il trattamento ogni 24 ore. Il trattamento combinato AZDC-TSA prevede, invece, la somministrazione di AZDC $10 \mu\text{M}$ per 72 ore, rinfrescando il trattamento ogni 24 ore, seguito da trattamento con TSA $1 \mu\text{M}$ per 24 ore.

3.5.2 CHEMIOTERAPICI

Le cellule Toledo e OCI-LY 10 sono state trattate con i farmaci chemioterapici Rituximab e Doxorubicina per valutare il loro effetto sull'espressione delle varianti trascrizionali di CLU. Il Rituximab, un anticorpo monoclonale il cui bersaglio molecolare è la proteina di superficie CD20, è comunemente utilizzato nella terapia contro malattie in cui si ha un'iperproliferazione dei linfociti B. La Doxorubicina è un intercalante del DNA che inibisce la sintesi di acidi nucleici ed è attiva soprattutto in fase S del ciclo cellulare. Questi farmaci sono comunemente utilizzati nel trattamento chemioterapico di una vasta gamma di tumori tra cui i linfomi non-Hodgkin. 24 ore prima dei trattamenti le cellule Toledo e OCI-LY 10 sono state seminate alla densità di 5×10^5 cell/mL. Il trattamento con Rituximab prevede la somministrazione del farmaco alla concentrazione di $10 \mu\text{g/mL}$ (R10) o $100 \mu\text{g/mL}$ (R100) per 48 ore, mentre il trattamento con Doxorubicina prevede la somministrazione del farmaco alla concentrazione di $0.1 \mu\text{M}$ (Doxo 0.1) o $1 \mu\text{M}$ (Doxo 1) per 48 ore.

3.6 ESTRAZIONE RNA E PREPARAZIONE cDNA

L'RNA è stato estratto con 1 mL di Trizol (Fisher Molecular Biology, Rome, IT) da tutte le linee cellulari accuratamente lavate con buffer fosfato (PBS) freddo. La purificazione dell'RNA da Trizol è eseguita utilizzando il kit commerciale PureLink® RNA Kit (Ambion, Austin, TX) e l'RNA ottenuto è risospeso in H₂O DEPC a cui è stata addizionata 0.2 U/μL di RNAsina (Promega, Madison, WI), un inibitore di RNasi. L'RNA così ottenuto è quantificato mediante l'ausilio di uno spettrofotometro (Biospectrometer, eppendorf, Hamburg, DE) e ne è stata verificata l'integrità mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

Per ogni reazione viene retrotrascritto 1 μg di RNA in un volume di reazione pari a 20 μL utilizzando ImProm-II reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). Prima di procedere con la retrotrascrizione, l'RNA è portato a volume di 7 μL con H₂O DEPC addizionata di 0.2 U/μL di RNAsina, viene scaldato a 100 °C per 5 minuti e successivamente posto in ghiaccio per 10 minuti. La sintesi di cDNA è stata eseguita aggiungendo all'RNA la miscela di reazione contenente: 1X ImProm-II reaction buffer, 3 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI), 0.5 mM dNTPs (Promega, Madison, WI) e 0.5 μg di Random Primers (Promega, Madison, WI). Al fine di favorire l'appaiamento degli esameri all'RNA, la miscela di reazione è stata incubata 10 minuti a 25 °C prima di aggiungere 1 μL di ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). Successivamente, ogni reazione è incubata 60 minuti a 42 °C per permettere la sintesi e l'estensione del primo filamento di cDNA. L'enzima è stato poi inattivato termicamente incubando ogni reazione 15 minuti a 70 °C.

3.7 RT-PCR E Real-Time PCR QUANTITATIVA (qPCR)

Il cDNA ottenuto da WI38, PNT1a, PC3, DU145, BEAS2B, HTB-125, MCF7, e A549 è stato amplificato mediante RT-PCR utilizzando coppie di primer specifiche capaci di discriminare tra le varianti CLU 1 e CLU 2. Il primer forward utilizzato per amplificare CLU 1 appaia a valle della TATA box identificata entro la sequenza del trascritto. L'amplificazione dell'esone 1a della variante NM_001831 è stata inoltre condotta utilizzando una coppia di primer che si appaia a monte della TATA box presente nell'esone 1a (primer: NM_001831 For; NM_0010831 Rev). È stata inoltre utilizzata una coppia di primer che appaia nella zona comune di tutti i trascritti di CLU in modo da poterne valutare il contenuto totale (primer: CLU TOT For, CLU TOT Rev). Come controllo positivo e housekeeper di riferimento delle diverse amplificazioni è stato scelto la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Le

3. Materiali e metodi

reazioni di amplificazione sono state eseguite con 10 μ L di cDNA retrotrascritto in un volume di reazione di 50 μ L utilizzando come enzima la GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI). Le sequenze dei primer, le temperature di appaiamento e il numero di cicli di amplificazione sono riportate in Tabella 3, mentre la miscela di reazione è la seguente: 1X GoTaq[®] Flexi Green reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 U GoTaq[®] Flexi DNA Polimerasi (Promega, Madison, WI) e 0.6 μ M per ogni primer.

In tutte le linee cellulari, l'abbondanza relativa degli mRNA corrispondenti alle varianti trascrizionali CLU 1 e CLU 2, oltre che la quantità totale di CLU (CLU TOT), è stata testata in Real-Time PCR (qPCR) sia in condizioni basali sia in seguito a specifici trattamenti. Con la stessa tecnica, nei cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}, nelle cellule PC3 sovraesprimenti CLU in forma transiente e nelle cellule PC3 in cui CLU è silenziata, oltre a valutare la quantità totale di CLU (CLU TOT), è stata valutata l'abbondanza relativa di p65 e di alcuni sui geni target coinvolti nel processo di EMT tra cui uPA, CTSB e MMP-9.

La qPCR è una tecnica di PCR che permette sia di amplificare il DNA sia di quantificarlo. Al termine di ogni ciclo di amplificazione, il DNA è quantificato grazie alla presenza nella miscela di reazione di una molecola fluorescente che s'intercala al DNA e l'intensità della fluorescenza sarà direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione. Dopo i primi cicli di amplificazione in cui la fluorescenza non supera il rumore di fondo, questa raggiunge un livello soglia solo dopo che un certo numero di copie dell'amplicone d'interesse è stato sintetizzato. Il ciclo di amplificazione in cui avviene il superamento del rumore di fondo è definito ciclo soglia (Ct) e il suo valore sarà tanto più basso quanto più templatato era originariamente presente nel campione. L'abbondanza relativa degli mRNA in ogni reazione di qPCR è stata testata utilizzando 2 μ L di cDNA e 2X Premier Ex Taq in 25 μ L di volume di reazione. La sequenza dei primer utilizzati, le temperature di appaiamento e il numero di cicli sono riportati in Tabella 3. Tutte le amplificazioni sono state effettuate con lo strumento MJ Opticon 4 Instrument (MJ Research, Waltham, MA). Se non diversamente specificato, la quantità relativa di ogni mRNA è stata calcolata con il metodo denominato $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹³⁸, utilizzando la GAPDH come gene housekeeper per normalizzare i dati. Fanno eccezione le cellule Toledo e OCI-LY 10 in cui al posto della GAPDH come gene housekeeper è stata utilizzata la β 2-microglobulina (B2M). Brevemente, il ΔCt si ottiene sottraendo al Ct del gene target il Ct del gene housekeeper. Il $\Delta\Delta Ct$ è ottenuto sottraendo al ΔCt di ogni condizione il ΔCt del campione controllo scelto come riferimento. Il valore che si

ottiene è utilizzato come esponente nella formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che tiene conto sia dell'amplificazione esponenziale tipica di ogni reazione di PCR, sia il fatto che il Ct è raggiunto tanto prima, quanto più template era presente nel campione di partenza. Il valore risultante rappresenta quante volte un mRNA è più o meno espresso rispetto alla condizione stabilita come riferimento e di conseguenza, a valori più alti corrisponderà una maggiore quantità di mRNA di partenza.

Per quanto riguarda i cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}, l'analisi dei dati non è stata condotta con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ma sono state confrontate le medie dei ΔCt normalizzati dei cloni PC3_{mock} con quelle dei cloni PC3_{CLU}. Poiché con questo tipo di elaborazione non vi è l'elevamento a una potenza negativa dei Ct, ma si tiene conto solo dei ΔCt dei campioni, ne consegue che a valori bassi di ΔCt corrispondano livelli più alti di mRNA di partenza.

Per entrambi i tipi di elaborazione, i risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) di esperimenti condotti almeno in triplicato. La significatività statistica della variazione dei livelli d'espressione dei geni d'interesse, nelle varie condizioni sperimentali, è stata valutata con il t-test a 2 code.

3.8 ESTRAZIONE PROTEINE, SDS-PAGE E WESTERN BLOT

Le cellule cresciute in adesione sono raccolte e lisate utilizzando RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100) addizionato d'inibitori di proteasi e di fosfatasi (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE). Le cellule cresciute in sospensione sono state centrifugate a 1,200 rpm per 5 minuti e risospese in RIPA buffer. Sia per le cellule cresciute in adesione, sia per quelle cresciute in sospensione, i lisati cellulari sono stati mantenuti in agitatore orbitante a 4 °C per un'ora e centrifugati a 12,000 rpm per 20 minuti a 4 °C al fine di recuperare il surnatante contenente le proteine solubili. La concentrazione delle proteine intracellulari è stata determinata con il metodo Lowry utilizzando il kit BioRad DC Protein assay (Bio-Rad, Berkley, CA) e soluzioni di albumina sierica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) a concentrazione nota (da 2.5 a 20 μ g) come standard per la costruzione della retta di taratura. L'assorbanza è misurata a 750 nm mediante lo strumento EnSpire[®] Multimode Plate Readers (PerkinElmer, Waltham, MA). Per la determinazione delle proteine extracellulari, 1 mL di mezzo di cultura per ogni condizione è centrifugato a 1,200 rpm per 5 minuti e il surnatante contenente le proteine solubili, è conservato per l'elettroforesi monodimensionale.

3. *Materiali e metodi*

Se non diversamente specificato, 70 µg di proteine intracellulari/lane o 35 µL di proteine del mezzo di coltura/lane sono state separate mediante elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide al 12% (SDS-PAGE) e trasferite su una membrana in PVDF (Millipore, Billerica, MA) precedentemente attivata in metanolo. L'efficienza di trasferimento è stata confermata sottoponendo le membrane a colorazione con reattivo Red Ponceau S (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE). Le membrane, dopo essere state incubate per 4-6 ore a temperatura ambiente con opportuna soluzione bloccante al fine di bloccare i siti di legame aspecifici, sono state ibridate per 16 ore a 4 °C con i seguenti anticorpi primari: anticorpo monoclonale anti-CLU (05-354, Millipore, Billerica, MA) diluito 1:1000 in blocking solution 1% (Roche, Basel, CH); anticorpo monoclonale anti-piruvato chinasi muscolare isoforma 1/2 (PKM1/2) (#3106, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluito 1:1000 in BSA 3%; anticorpo monoclonale anti-H3K4me3 (17-614, Millipore, Billerica, MA) diluito 1:500 in milk 5% (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE); anticorpo monoclonale anti-calreticulina (601, Stressgen SPA, San Diego, CA) diluito 1:500 in milk 5%; anticorpo monoclonale anti-caspasi-3, -caspasi-7, -poly-ADP-ribose polymerase (PARP) (#9915, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluiti 1:1000 in blocking solution 1%; anticorpo monoclonale anti-p65 (#6956, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluito 1:1000 in milk 5%; anticorpo monoclonale anti-p-p65_{S536} (#3033, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluito 1:500 in Albumina di siero bovino (BSA) 5%; anticorpo anti-β-actina (SC:81178, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) diluito 1:200 in blocking solution 1%. Successivamente, le membrane sono state incubate 1 ora a temperatura ambiente con opportuno anticorpo secondario IgG coniugato alla perossidasi di rafano (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) diluito 1:5000. Le membrane sono state trattate con il substrato chemiluminescente, BM chemiluminescence Blotting Substrate, POD (Roche, Basel, CH) ed esposte alle lastre fotografiche Hyperfilm ECL (Amersham, United Kindom, UK) per rilevare eventuali bande immunoreattive. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Al fine di valutare la frazione di p65 fosforilata rispetto alla quantità totale presente entro le cellule, dopo aver effettuato l'analisi WB con anticorpi rivolti contro p65 e p-p65_{S536}, è stata eseguita un'analisi densitometrica delle bande immunoreattive con l'ausilio del software Quantity One (Bio-Rad, Berkley, CA). In seguito alla scansione digitale delle lastre, è stata valutata l'intensità delle bande immunoreattive stabilendone il suo contenuto in pixel. Per ogni campione, al valore della banda in pixel di p65 e p-p65_{S536} è stato sottratto il valore in

pixel del bianco, corrispondente al fondo della lastra, e il valore ottenuto è stato normalizzato per il valore in pixel della β -actina, gene housekeeper impiegato come controllo quantitativo del caricamento di ogni campione.

3.9 LOCALIZZAZIONE CELLULARE

3.9.1 FRAZIONAMENTO CELLULARE

La localizzazione della variante CLU 2 in cellule Toledo in condizioni basali e trattate R10, R100, Doxo 0.1 e Doxo 1, è stata valutata separando la frazione nucleare/RE dalla frazione citoplasmatica utilizzando il kit commerciale CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE), seguendo le istruzioni fornite della ditta produttrice. Brevemente, le cellule dopo la semina e il trattamento secondo protocollo (paragrafo 3.5.2) sono lavate con PBS freddo. Tra i possibili buffer per la risospensione delle cellule, in dotazione con il kit, è stato utilizzato l'Hypotonic Lysis Buffer. La rottura delle membrane extracellulari è stata eseguita aggiungendo alla sospensione cellulare 0.3% IGEPAL (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) e operando 4 passaggi in omogenizzatore con pestello in vetro. In seguito, le cellule sono state centrifugate a 11,000 g per 5 minuti a 4 °C per separare i nuclei dal citosol. Il surnatante, corrispondente alla frazione citosolica, è conservato in un nuovo tubo, mentre i nuclei sono risospesi nel buffer di estrazione in dotazione con il kit, e agitati per 15 minuti con vortex per rompere le membrane nucleari. La concentrazione delle proteine estratte dalle differenti frazioni è stata determinata con il metodo Lowry utilizzando il kit BioRad DC Protein assay (Bio-Rad, Berkley, CA). 30 μ g di proteine per ogni frazione cellulare sono separati mediante SDS-PAGE e analizzati in WB secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.8.

3.9.2 SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA

Per valutare la localizzazione di CLU, le cellule PC3 e DU145 sono state seminate su vetrino coprioggetto alla densità di 70×10^3 cell/mL e sono state sottoposte a trattamento con TSA o AZDC-TSA come da protocollo 24 ore dopo la semina. I cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU} sono stati invece seminati 72 ore prima dell'esperimento alla densità di 7.5×10^4 cell/mL e oltre alla localizzazione di CLU è stata valutata anche localizzazione di p-p65_{S536}. Il protocollo di fissaggio e permeabilizzazione è in funzione dell'anticorpo primario utilizzato. Nello

3. *Materiali e metodi*

specifico per la rilevazione di CLU, dopo aver recuperato i vetrini, le cellule adese vengono prima lavate in buffer fosfato di Dulbecco addizionato con calcio e magnesio (D-PBS) (Lonza, Basel, CH), poi fissate e permeabilizzate in una soluzione metanolo:acetone 1:1 per 10 minuti a -20 °C. Diversamente per p-p65_{S536}, dopo il lavaggio in D-PBS, si è fatto ricorso alla fissazione con paraformaldeide 4% in PBS per 15 minuti e permeabilizzazione con metanolo per 2 minuti a -20 °C. Dopo aver lasciato asciugare i vetrini all'aria e aver effettuato un lavaggio di 10 minuti con D-PBS, i siti di legame aspecifici sono stati bloccati incubando le cellule con Horse Blocking serum (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) in camera umida. Prima di proseguire con l'ibridizzazione con l'anticorpo primario sono stati effettuati due lavaggi con BSA 0.3% in D-PBS. Per l'ibridizzazione sono stati utilizzati gli stessi anticorpi descritti per l'analisi WB, ma in questo caso l'anticorpo primario anti-CLU è diluito 1:50 in una soluzione di BSA 3% in D-PBS, mentre quello anti-p-p65_{S536} è diluito 1:200 in una soluzione di BSA 3% in D-PBS. Gli anticorpi primari sono lasciati a contatto con le cellule per un'ora a temperatura ambiente. Dopo 2 lavaggi da 10 minuti con BSA 0.3% in D-PBS, si prosegue con l'ibridizzazione con opportuno anticorpo secondario fluorescente un'ora a temperatura ambiente. Per la rilevazione di CLU si è utilizzato un anticorpo secondario anti-IgG fluorescente verde (Alexa FlourTM 488, Invitrogen, Waltham, MA), mentre per la rilevazione di p-p65_{S536} si è utilizzato un anticorpo secondario anti-IgG fluorescente rosso (Alexa FlourTM 568, Invitrogen, Waltham, MA), entrambi diluiti 1:200 in BSA 3% in D-PBS. Dopo due lavaggi con BSA 0.3% in D-PBS e uno con D-PBS, i nuclei sono stati marcati con uno specifico colorante, il 4',6-diamidino-2-fenilindolo 5% (DAPI) (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) diluito 1:5000 in D-PBS, per 5 minuti a temperatura ambiente in camera umida al buio. I vetrini coprioggetto sono stati quindi lavati con D-PBS e montati con Mowiol (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) su un vetrino da microscopia. I campioni così preparati sono stati visualizzati mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiovert 200 e le relative immagini digitali sono state acquisite mediante videocamera a colori direttamente collegata al microscopio.

3.10 SAGGI DI VITALITÀ, PROLIFERAZIONE E CICLO CELLULARE

3.10.1 SAGGIO WST-1

La vitalità cellulare è stata valutata in cellule PC3 e DU145 in cui è stata silenziata CLU utilizzando il saggio colorimetrico WST-1 (Roche, Basel, CH). Questo saggio è basato sulla capacità dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi di idrolizzare l'anello del sale 2-(4-indofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disolfofenil)-2H-tetrazolio di colore giallo, portando alla formazione di formazano, un sale dal colore blu. Poiché solo nelle cellule metabolicamente attive la succinato deidrogenasi è in grado di produrre formazano, l'analisi dell'assorbanza a 450 nm permette di discriminare le cellule metabolicamente attive da quelle inattive.

Le cellule PC3 e DU145 sono state seminate in piastra da 96 pozzetti alla densità di 7.5×10^4 cell/mL e sono state trasfettate con siRNA CLU o NC seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 3.4. 18 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state sottoposte al trattamento TSA e al trattamento AZDC-TSA come precedentemente descritto. Al termine dei trattamenti, le cellule sono state incubate con il WST-1 un'ora a 37 °C e la produzione di formazano è stata valutata misurando l'assorbanza a 450 nm mediante lo strumento EnSpire® Multimode Plate Readers. I dati sono espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti ognuno condotto in ottuplicato; la significatività statistica è stata valutata con il t-test a 2 code.

3.10.2 SAGGIO CRISTAL VIOLETTO

La proliferazione cellulare dei cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU} è stata valutata con il saggio colorimetrico con cristal violetto, un colorante basico ad alta affinità per le specie acide come il DNA. Una volta penetrato all'interno delle cellule, il cristal violetto viene estratto con sodio citrato e può essere quantificato misurando l'assorbanza a 540 nm. Il valore di assorbanza misurato sarà proporzionale al numero di cellule presenti.

I cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU} sono stati seminati alla densità di 7.5×10^4 cell/mL e il saggio è stato eseguito dopo 24, 48, 72, e 96 ore dalla semina. Allo scadere del tempo, le cellule sono lavate con PBS prima di essere fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono poste a contatto con una soluzione contenente cristal violetto 0.5% (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) in metanolo al 20% per 15 minuti. Si lavano accuratamente le cellule con H₂O e si estrae il colorante penetrato nelle cellule con una

3. Materiali e metodi

soluzione di sodio citrato 0.1 M in etanolo al 50%, pH 4.2. L'assorbanza a 540 nm è misurata con l'ausilio di uno spettrofotometro (Biospectrometer, Eppendorf, Hamburg, DE).

3.10.3 ANALISI FACS MONODIMENSIONALE

I cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU} sono stati sottoposti all'analisi FACS monodimensionale al fine di valutare l'effetto della sovraespressione di CLU sul ciclo cellulare. L'analisi citofluorimetrica permette di conoscere la distribuzione di una popolazione di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare tramite la quantificazione del DNA presente all'interno di ogni singola cellula. Quest'ultimo è determinato mediante l'uso di un colorante fluorescente e intercalante in grado di legare l'acido nucleico con alta affinità. Il colorante, dopo essere stato eccitato con una radiazione luminosa ad opportuna lunghezza d'onda, emetterà una fluorescenza la cui intensità sarà direttamente proporzionale alla quantità di colorante legato e quindi alla quantità di DNA. Il propidio ioduro, un intercalante fluorescente del DNA con una lunghezza d'onda d'eccitazione che ricade nel verde (480-550 nm) e una lunghezza d'onda d'emissione di 617 nm, è il colorante più comunemente utilizzato per quantificare il DNA presente nelle cellule. Raggiunto l'80% di confluenza sia le cellule PC3_{mock}, sia le PC3_{CLU} sono raccolte con Tripsina/EDTA 0.2 g/mL, lavate 2 volte con BSA 1% in PBS freddo e centrifugate a 1,000 rpm per 5 minuti. Le cellule sono fissate con etanolo freddo al 70% e conservate a -20 °C fino al momento della colorazione del DNA. Al momento della marcatura le cellule vengono centrifugate a 250 rpm e risospese nel tampone di colorazione costituito da propidio ioduro 20 µg/mL e RNasi 0.1 mg/mL in PBS. La sospensione cellulare così ottenuta è stata analizzata considerando la distribuzione delle cellule durante le diverse fasi del ciclo cellulare tramite analisi citofluorimetrica, utilizzando un FACS Calibrator (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). I dati sono stati analizzati con il software CellFIT (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

3.11 ANALISI BIOINFORMATICHE

3.11.1 ANALISI DEI TSS E DELLE REGIONI REGOLATORIE DI CLU

Al fine di individuare le possibili regioni regolatrici del gene di CLU, è stata effettuata un'analisi *in silico* con il software MatInspector (www.genomatix.de). Il programma, basato su una vasta libreria di matrici, permette di individuare in una sequenza di DNA genomico gli

mRNA che possono essere prodotti, i TSS, i promotori e i siti di legame per fattori di trascrizione. All'interno del software è possibile selezionare un sottoinsieme di singole matrici o "famiglie di matrici". Ogni matrice è caratterizzata da una sequenza di base, denominata core sequence, in cui si ritrovano i siti altamente conservati, di solito in numero di 4. La massima somiglianza (core similarity) si raggiunge solo quando si trova un'esatta corrispondenza tra le basi della core sequence e la sequenza indagata. Solo se la sequenza inserita in input raggiunge il valore di core similarity, è calcolata la matrice di similarità (matrix similarity), ovvero una matrice che confronta la sequenza input con i nucleotidi altamente conservati della matrice. Una perfetta corrispondenza ottiene un punteggio di 1, mentre è considerato una "buona" corrispondenza quando la matrice di similarità ha un valore inferiore a 0.8. Il programma restituisce in output solo quei risultati che raggiungono la soglia di core similarity e di matrix similarity impostati dall'utente.

La sequenza che è stata inserita in MatInspector come input corrisponde alla sequenza di CLU depositata in NCBI con l'identificativo NM_001831 ± 2000 pb, mentre i parametri impostati per la ricerca sono stati di 1 per la core similarity e di 0.8 per la matrix similarity.

3.11.2 ANALISI MICROARRAY

I livelli di mRNA di CLU e p65 in biopsie di campioni umani sono stati analizzati sfruttando uno studio condotto su 171 campioni con un microarray Affimetrix, i cui risultati sono stati depositati nel database GEO2R (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) con il codice identificativo GSE6919. I dati grezzi sono stati analizzati con il software GCOS 1.1 e i valori d'espressione riportati nel database sono stati normalizzati per rimuovere la variazione d'intensità complessiva del chip. Le biopsie sono state divise in 4 gruppi sulla base della diagnosi istologica: 18 biopsie prostatiche derivanti da individui sani, 63 biopsie di tessuto prostatico normale adiacente al tumore primario, 65 biopsie di PCa primario, e 24 biopsie di metastasi al fegato, polmone, linfonodi e reni, derivanti da 4 pazienti con fenotipo CRPCa. I livelli d'espressione di CLU e di p65 nei diversi gruppi sono stati confrontati utilizzando la piattaforma GPL8300 e l'analisi statistica è stata condotta con il test Anova a una via utilizzando il metodo Dunn's poiché la varianza tra i campioni è alta.

3.12 CLONAGGIO DELLE SEQUENZE P1 E P2 NEL PLASMIDE REPORTER pGL4

La verifica dell'attività promotrice delle sequenze P1 e P2, ritrovate dall'analisi bioinformatica, è stata testata clonando le due sequenze nel plasmide reporter privo di promotore pGL4.10 (Promega, Madison, WI). Questo vettore contiene la CDS del gene che codifica per l'enzima luciferasi a valle un sito di policlonaggio ed è privo di promotore. L'espressione della luciferasi risulta quindi dipendente della sequenza inserita con il clonaggio: si avrà espressione del gene solo nel caso in cui la sequenza clonata all'interno del sito di policlonaggio sia un promotore.

Le sequenze corrispondenti a P1 e P2 sono state amplificate con una reazione di PCR utilizzando come template il DNA genomico estratto da cellule PC3 con il kit commerciale QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Venlo, NL), in accordo con le istruzioni fornite della ditta produttrice. La reazione di amplificazione è stata eseguita con l'enzima GoTaq[®] Flexi (Promega, Madison, WI), aggiungendo 200 ng di DNA genomico alla miscela di reazione composta da: 1 x Green GoTaq[®] Flexi Buffer, 1.25 U GoTaq[®] Flexi, 0.2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 4% dimetil solfossido (DMSO), 0.5 μM primer For e 0.5 μM primer Rev. Le sequenze dei primer, le temperature di appaiamento e il numero di cicli sono riportati in Tabella 3. 10 ng degli ampliconi ottenuti sono stati subclonati nel plasmide pCR[®]2-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizzando la T4 DNA ligasi (New England Biolabs, Ipswich; MA). La reazione è stata eseguita utilizzando un rapporto molare tra vettore e inserto pari a 1:5. I vettori TOPO-P1 e TOPO-P2 ottenuti, dopo essere stati propagati in batteri *E. coli* ceppo TOP10 F, sono stati isolati e purificati con il kit commerciale PureYelde[™] Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI), secondo le istruzioni fornite della ditta produttrice. La successiva digestione di TOPO-P1 e TOPO-P2 con gli enzimi di restrizione XhoI e HindIII (Promega, Madison, WI), condotta secondo le istruzioni fornite della ditta produttrice, ha permesso di ottenere i frammenti P1 e P2. In seguito, tali frammenti sono stati clonati nel plasmide pGL4 utilizzando l'enzima T4 DNA ligasi mantenendo un rapporto tra vettore e inserto pari a 1:6. I vettori pGL4-P1 e pGL4-P2 ottenuti sono stati propagati in batteri *E. coli* ceppo TOP10 F e successivamente isolati e purificati mediante il kit commerciale PureYelde[™] Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, WI), secondo le istruzioni fornite della ditta produttrice. La correttezza delle sequenze clonate è stata verificata mediante sequenziamento (BMR genomics, Padova, IT).

3.13 SAGGI IN LUMINESCENZA

In questo lavoro di tesi tutti i saggi eseguiti in luminescenza si basano sull'attività dell'enzima luciferasi di *Photinus pyralis*. Questo enzima ha la caratteristica di emettere radiazione luminosa durante la reazione di ossidazione del substrato luciferina in presenza del cosubstrato ATP-Mg²⁺. Il saggio si basa sul principio che l'attività della luciferasi sarà tanto maggiore quanta più elevata è l'attività del promotore clonato a monte della luciferasi e trasfettato in cellule umane. L'attività dell'enzima è rilevata con il kit commerciale Britelite™ plus reactive (PerkinElmer, Waltham, MA), seguendo le istruzioni fornite della ditta produttrice e la radiazione luminosa emessa è stata misurata con lo strumento EnSpire® Multimode Plate Readers.

3.13.1 SAGGIO D'ATTIVITÀ DI P1 E P2

Per valutare l'attività promotrice delle sequenze P1 e P2, le cellule PC3 sono state seminate in piastra da 96 pozzetti alla densità di 7.5×10^4 cell/mL 24 ore prima della trasfezione con i vettori pGL4-P1 o pGL4-P2. Il reattivo di trasfezione impiegato è il FuGENE® HD e il protocollo utilizzato è lo stesso descritto nel paragrafo 3.3 per la trasfezione del vettore pIRES (per ogni pozzetto 0.2 µg di DNA ogni 0.5 µL di FuGENE® HD). Il controllo dell'esperimento è costituito da cellule PC3 trasfettate con il plasmide pGL4 privo di una sequenza promotrice clonata all'interno. L'attività della luciferasi prodotta dalle cellule è stata valutata sia in condizioni basali, sia dopo il trattamento AZDC-TSA. I valori di luminescenza sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine. L'efficienza di trasfezione di ogni esperimento è stata valutata trasfettando le cellule con il vettore pEGFP-N1. I dati sono espressi come media ± DS di tre esperimenti indipendenti ognuno condotto in triplicato; la significatività statistica è stata valutata con il t-test a 2 code.

3.13.2 SAGGIO D'ATTIVITÀ DI p65

L'attività di NF-κB è stata valutata nei cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}, oltre che nelle cellule PC3 sovraesprimenti CLU in forma transiente e nelle cellule PC3 in cui CLU è silenziata, utilizzando il plasmide reporter pNFκB-luc (631904, Clontech, Mountain View, CA). Questo vettore contiene la CDS del gene della luciferasi sotto il controllo del promotore timidina chinasi dell'Herpes simplex (HSV-TK). A monte del promotore si trovano, in sequenza, 6 ripetizioni dell'elemento enhancer (κB) a cui si lega il fattore di trascrizione NF-κB

3. Materiali e metodi

promuovendo così la trascrizione della luciferasi. La luminescenza rilevata sarà proporzionale alla frazione di NF-kB attivo presente all'interno della cellula.

Per i cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}, 24 ore prima della trasfezione con il vettore reporter pNFkB-luc, le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti alla densità di 12.5×10^4 cell/mL. Il reattivo di trasfezione impiegato è il FuGENE[®] HD e il protocollo utilizzato è lo stesso descritto nel paragrafo 3.3 per la trasfezione del vettore pIRES (per ogni pozzetto 0.2 µg di DNA ogni 0.5 µL di FuGENE[®] HD).

Per valutare l'attività di NF-kB nelle cellule che sovraesprimono CLU in modo transiente, si è proceduto trasfettando in cellule PC3 il plasmide pNFkB-luc contemporaneamente al plasmide pIRES-CLUfull o, in alternativa, al plasmide pIRES-mock. Le cellule sono seminate in piastra da 96 pozzetti alla densità di 12.5×10^4 cell/mL 24 ore prima della trasfezione. Il reattivo di trasfezione impiegato è il FuGENE[®] HD e per ogni pozzetto vengono impiegati 0.5 µL di FuGENE[®] HD e 0.2 µg di DNA totale: 0.1 µg di pNFkB-luc e 0.1 µg di pIRES-CLUfull o pIRES-mock.

Invece, per valutare l'attività di NF-kB nelle cellule PC3 delete per CLU, è stata eseguita una co-trasfezione di 100 ng di plasmide pNFkB-luc insieme a 1 pmol di siRNA CLU (vedere paragrafo 3.4 per la sequenza del siRNA) o a 1 pmol di siRNA NC, utilizzando il reattivo di trasfezione Lipofectamine[®] 3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Le cellule PC3 sono seminate alla densità di 12.5×10^4 cell/mL 24 ore prima della trasfezione. Allo scadere del tempo, 0.3 µL di Lipofectamine[®] 3000 sono stati diluiti in 5 µL di mezzo DMEM privo di siero, mentre in parallelo è stata preparata una seconda miscela contenente il DNA plasmidico e il siRNA, diluiti in 5 µL di mezzo DMEM privo di siero. Le due miscele sono state messe a contatto per 5 minuti a temperatura ambiente e 10 µL della miscela ottenuta sono stati aggiunti alle cellule coltivate in 90 µL di mezzo completo, ma privo di antibiotici.

L'attività della luciferasi presente nelle cellule è stata valutata 24 ore dopo le manovre di trasfezione. I valori di luminescenza sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine. L'efficienza di trasfezione di ogni esperimento è stata valutata trasfettando le cellule con il vettore pEGFP-N1. I dati sono espressi come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti ognuno condotto in sestuplicato; la significatività statistica è stata valutata con il t-test a 2 code.

3.14 MODIFICAZIONI EPIGENETICHE

3.14.1 METHYLATION SPECIFIC PCR

Lo stato di metilazione del DNA in corrispondenza delle regioni regolatrici di CLU è stato valutato in WI38, PC3 e DU145 con la methylation specific PCR (MSP). L'incubazione del DNA d'interesse con bisolfito di sodio determina la conversione dei residui di citosina non metilata in uracile, mantenendo invece le citosine metilate invariate. Il kit QIAmp DNA mini Kit (Qiagen, Venlo, NL) è stato utilizzato per estrarre il DNA genomico dalle cellule WI38, oltre che dalle cellule PC3 e DU145 sia in condizioni basali, sia in seguito ai trattamenti AZDC e AZDC-TSA. Successivamente, 500 µg di DNA genomico per ogni condizione sono stati sottoposti a conversione con bisolfito di sodio utilizzando il kit EZ DNA Methylation Gold™ Kit (Zymoresearch, Irvine, CA) in accordo con le istruzioni fornite della ditta produttrice. L'efficienza di conversione con bisolfito è stata verificata allestendo due reazioni di PCR con una coppia di primer in grado di appaiarsi alla sequenza di DNA, indipendentemente dal suo stato di metilazione e utilizzando alternativamente come template il DNA genomico prima e dopo la conversione con bisolfito. I primer utilizzati per l'amplificazione MSP, capaci di discriminare tra DNA metilato e non metilato, sono stati disegnati con il software MethPrimer. La reazione di PCR è stata condotta con la polimerasi HotStart Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), aggiungendo 100 ng di DNA alla miscela di reazione composta da: 1x GoTaq® Hot Start Green reaction buffer, 1.25 U di HotStart Taq DNA Polymerase, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.3 µM primer For e 0.3 µM primer Rev. In Tabella 3 sono riportate le sequenze dei primer e le condizioni di PCR.

3.14.2 IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA

La valutazione delle modifiche istoniche associate ai promotori P1 e P2 in condizioni basali e in seguito a trattamento AZDC-TSA è stata condotta per mezzo dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). La tecnica si basa sul fatto che è possibile convertire le interazioni deboli tra il DNA e le proteine che vi sono legate in legami covalenti, mediante una reazione di fissazione con formaldeide (reazione di cross-link). I complessi DNA-proteina sono quindi sottoposti a frammentazione prima di essere immunoprecipitati con uno specifico anticorpo rivolto contro la proteina che s'intende analizzare. La successiva rottura dei legami tra DNA e proteina target (reazione di reverse cross-link) permette di identificare i frammenti di DNA che si trovano associati alla proteina target.

3. *Materiali e metodi*

Per ogni condizione sperimentale testata sono state utilizzate 20×10^6 cellule per la preparazione della cromatina che è stata eseguita come descritto da Rivera-Gonzalez e collaboratori¹³⁹. Brevemente, le cellule PC3 e DU145, dopo semina e opportuni trattamenti, sono state staccate dal supporto di crescita con tripsina/EDTA 0.2 g/mL e risospese in 5 mL di mezzo completo. La reazione di cross-link è stata eseguita aggiungendo alle cellule 0.5% di formaldeide per 5 minuti a temperatura ambiente e interrotta aggiungendo 125 μ M glicina. Le cellule, dopo essere state lavate con PBS, sono risospese in Swelling Buffer freddo (5 mM Pipes pH 8.0, 85 mM KCl, 0.2% NP-40) contenete inibitori di proteasi e la successiva agitazione in ghiaccio, per 20 minuti permette la rottura delle membrane cellulari. I nuclei così ottenuti, sono centrifugati e risospesi in TSE Buffer 150 (0.1% SDS, 1% Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) addizionato di inibitori di proteasi. La frammentazione della cromatina è stata eseguita in un bagnetto di acqua e ghiaccio con sonicatore a micropunta operando 20 cicli di sonicazione da 30 secondi ciascuno. La cromatina ottenuta è stata centrifugata a 14,000 rpm per 30 minuti a 4 °C prima di essere conservata a -80 °C in aliquote da 20 μ g di DNA ciascuna. Per ogni condizione sperimentale, la qualità dei frammenti di DNA ottenuti in seguito a sonicazione è stata valutata mediante corsa su gel di agarosio allo 0.75%. Le aliquote di cromatina sonicata vengono immunoprecipitate e purificate con il kit commerciale Magna ChIP™ A (Millipore, Billerica, MA) che utilizza biglie magnetiche per la cattura dell'anticorpo, seguendo le istruzioni fornite della ditta produttrice. La ChIP è stata eseguita con i seguenti anticorpi: anti-TATA box binding protein (TBP) (17-10098, Millipore, Billerica, MA), anti-istone H3 lisina 9 acetilata (H3K9ac) (17-658, Millipore, Billerica, MA), anti-H3K27me3 (17-622, Millipore, Billerica, MA). In parallelo, per ogni condizione sperimentale è stata eseguita una ChIP utilizzando l'anticorpo anti-IgG, come controllo negativo.

Per ogni campione, prima di aggiungere l'anticorpo ed eseguire la reazione d'immunoprecipitazione, un volume pari all'1% del DNA totale è prelevato e conservato come DNA input per le successive analisi dei dati.

Al termine della reazione, ogni aliquota di cromatina immunoprecipitata e il relativo DNA input vengono sottoposti alla reazione di reverse cross-link per rompere i legami covalenti e il DNA è purificato. L'analisi quantitativa dei frammenti di DNA immunoprecipitati con la proteina d'interesse è eseguita mediante qPCR utilizzando primer che riconoscono specificatamente le sequenze di P1 e di P2. Le sequenze dei primer, le temperature di appaiamento e il numero di cicli sono riportati in Tabella 3. Per l'analisi dei dati di qPCR si è

utilizzata la % input, un metodo basato sul confronto tra la frazione di DNA immunoprecipitato e la quantità iniziale di DNA input. In altre parole, si confronta il valore del Ct del campione immunoprecipitato con il valore del Ct del DNA inizialmente presente all'interno del campione, ovvero il DNA input. Poiché il DNA input corrisponde all'1% della quantità di DNA sottoposto a immunoprecipitazione, il valore del Ct non può essere utilizzato grezzo, ma deve essere rapportato al 100%. Per far ciò si sottrae al valore del Ct grezzo 6.644, ovvero il $\text{Log}_2 100$. La differenza tra il Ct del campione immunoprecipitato e il Ct corretto per il fattore di diluizione del DNA input è utilizzata come esponente nella formula:

$$100 \times 2^{(\text{Ct campione immunoprecipitato} - \text{Ct input corretto})}$$

I risultati sono espressi come media \pm DS di tre esperimenti di immunoprecipitazione differenti. La significatività statistica è stata valutata con il t-test a 2 code.

3.15 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

Per valutare una possibile interazione fisica tra CLU e p65, i cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU} sono stati utilizzati in un esperimento di co-immunoprecipitazione con biglie di agarosio derivatizzate con la proteina G (Roche, Basel, CH). Dopo aver estratto e quantificato le proteine da un clone PC3_{mock} e da un clone PC3_{CLU}, per ogni singola co-immunoprecipitazione 500 μg di proteine totali sono risospesi in 500 μL di RIPA buffer addizionato di inibitori di proteasi e di fosfatasi. La fase di pre-clear, necessaria per eliminare tutte quelle proteine che in maniera aspecifica si legano alle biglie, è eseguita ponendo i lisati cellulari in agitazione a 4 °C con 50 μL di biglie per 30 minuti. Al termine, il lisato cellulare viene separato dalle biglie mediante centrifugazione a 12,000 rpm a 4 °C per 15 secondi e 30 μL sono prelevati e conservati da ogni lisato come campione input per la successiva analisi WB. Per permettere il riconoscimento tra proteina e anticorpo, ai lisati totali si aggiungono 5 μg di anticorpo e si mettono in agitazione a 4 °C per 18 ore. Nello specifico sono allestite 3 reazioni d'immunoprecipitazione per il clone PC3_{mock} e 3 reazioni per il clone PC3_{CLU} utilizzando i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale anti-CLU (05-354, Millipore, Billerica, MA), anticorpo monoclonale anti-p65 (#6956, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) e anticorpo monoclonale anti-mouse IgG (NI03, Millipore, Billerica, MA). Successivamente si aggiungono 50 μL di biglie e si mette in agitazione 4 ore a 4 °C per

3. Materiali e metodi

permettere il legame tra l'anticorpo e la proteina G presente sulle biglie. La miscela viene, poi, centrifugata a 12,000 rpm a 4 °C per 15 secondi, il surnatante contenente le proteine che non interagiscono con quella d'interesse viene prelevato e conservato in un nuovo tubo, mentre le biglie leganti l'immunocomplesso vengono lavate 4 volte con 1 mL RIPA contenente inibitori di proteasi e di fosfatasi. Terminati i lavaggi, le biglie sono risospese in una soluzione contenente RIPA addizionato di inibitori di proteasi e di fosfatasi, Laemmli buffer (buffer normalmente utilizzato in SDS-PAGE per la corsa elettroforetica dei campioni) e 100 nM ditiotreitolo in un volume finale di 30 μ L. Il reverse cross-link, cioè la rottura dei legami tra anticorpo e biglie, è eseguito ponendo la miscela a 100 °C per 3 minuti. Si centrifuga a 12,000 rpm per 15 secondi a temperatura ambiente per separare le biglie dal surnatante contenente le proteine co-immunoprecipitate con quella d'interesse. I campioni sono sottoposti ad analisi SDS-PAGE e WB secondo protocollo.

Tabella 3 Sequenze dei primer utilizzati per le differenti amplificazioni.

Tecnica	primer For 5'→3'	primer Rev 5'→3'	Ta (°C)	Cicli
<u>RT-PCR</u>				
CLU TOT	GGACATATGATGAAGACTCTGCTG	TCAGGCAGGGCTTACTACTCT	57	25
CLU 1	AGGAGCGCGGGCACAG	TCAGGCAGGGCTTACTACTCT	59	25
NM_001831	GCGAGCAGAGCGCTATAAAT	TCAGGCAGGGCTTACTACTCT	55	38
CLU 2	CAGAGCAAGAGGACTCATCC	TCAGGCAGGGCTTACTACTCT	57	38
GAPDH	AACCTGCCAAATATGATGAC	TTGAAGTCAGAGGAGACCAC	59	25
<u>qPCR</u>				
CLU TOT	TGATCCCATCACTGTGACGG	GCTTTTTGCGGTATTCCTGC	60	40
CLU 1	ACAGGGTGCCGCTGACC	CAGCAGAGTCTTCATCATGCC	58.4	40
CLU 2	CCACTGCGAACCCTCTCTAC	CCTTCACACCGAATCCATCT	60	40
GAPDH	AACCTGCCAAATATGATGAC	TTGAAGTCAGAGGAGACCAC	60	40
B2M	TATCCAGCGTACTCCAAAGA	GACAAGTCTGAATGCTCCAC	60	40
uPA	GTCGTGAGCGACTCCAAAGGCA	TTCACAGTGCTGCCCTCCGAA	58	40
CTSB	CTGTCCGATGAGCTGGTCAAC	TCGGTAAACATAACTCTCTGGGG	58	40
MMP-9	GCGCCAGCGAGGTGGACCGGA	ACGGGAGCCCTAGTCTCAGGGCAC	65	40
<u>Clonaggio</u>				
P1	CTCGAGGGGACAGTGATTGC	AAGCTTTCATCCCTCTCTGCC	55	3
			59	25
P2	CTCGAGCCAGAAGTTGTTGC	AAGCTTGGAGAGTAGAGAGG	40	3
			55	25
<u>MPS</u>				
Methylated CLU gene	ATTGGGATAGATAGTCGGGTAAAC	CTCCAAAAAAAACCCTAAAATAG	59	40
Unmethylated CLU gene	TTGGGATAGATAGTTGGGTAAATG	AACTCCAAAAAAAACCCTAAAATAC	61	40
CLU Wild Type	AGACAGCCGGGCTAACCGC	GAGAGACCCTGAGGTGCGG	59	40
<u>ChIP RealTime</u>				
TBP P1	ATTCTTTGGGCGTGAGTCAT	GTGGCTCTGCTCAAGGGTAG	62	40
TBP P2	ATGCAACAGCCTCAGCTTCT	CCAGAGAAAGTCCCTTTGGA	60	40
H3K9ac P1	ATTCTTTGGGCGTGAGTCAT	GTGGCTCTGCTCAAGGGTAG	62	40
H3K9ac P2	TCTGGCATGACAAAGGCTCT	GGGAGAAGAGATGGGGTCAG	62	40
H3K27me3 P1	TGCTCTCTTCTCCAGCACAA	TCCAGTAGGGAAGAGCCTGA	62	40
H3k27me3 P2	GTGAGACCACAGCCTTCCTG	GTTCCCCTTCTGAAATGGT	62	40

4. Risultati

PARTE 1

I PRODOTTI DEL GENE DI CLU: LE VARIANTI TRASCRIZIONALI CLU 1, CLU 2 E LA PROTEINA

4.1 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU 1 E CLU 2 IN DIFFERENTI LINEE CELLULARI

I livelli di espressione di CLU 1 e CLU 2 sono stati analizzati mediante RT-PCR in fibroblasti fetali normali (WI38), in cellule epiteliali prostatiche benigne immortalizzate (PNT1a) e in cellule prostatiche epiteliali androgeno indipendenti (PC3 e DU145) (Fig.10A). L'amplificazione è stata eseguita con primer specifici per l'esone 1a di CLU 1 e per l'esone 1b di CLU 2. Il primer forward utilizzato per amplificare CLU 1 appaia a valle della TATA box (Fig.2). È stata inoltre valutata la quantità totale di mRNA di CLU (CLU TOT) utilizzando una coppia di primer che amplifica un frammento di sequenza comune a tutti i trascritti. Dall'analisi emerge che i livelli di espressione di CLU TOT variano tra le diverse linee cellulari prese in esame e tra tutte, le WI38 sono le cellule che esprimono i maggiori livelli di trascritto. La variante trascrizionale più espressa è CLU 1 in tutte le linee esaminate, mentre l'espressione di CLU 2 è rilevabile, seppur a bassi livelli, solo nelle WI38. Nelle stesse linee cellulari si è tentato di amplificare l'esone 1a della variante NM_001831 utilizzando un primer forward che appaia a monte dell'AUG presente nell'esone 1a (Fig.2), ma la reazione di amplificazione non ha prodotto risultati in nessuna delle linee cellulari esaminate, neanche aumentando a 38 il numero di cicli della reazione di PCR (Fig.10B).

I livelli di espressione delle varianti CLU 1 e CLU 2 sono stati analizzati mediante RT-PCR anche in cellule epiteliali normali (HTB-125 e BEAS2B) e trasformate (MCF7 e A549) rispettivamente di mammella e di polmone (Fig.11). Analogamente a quanto osservato nelle cellule prostatiche, l'unica variante trascrizionale rilevabile è CLU 1, indipendentemente dalla malignità o meno della linea cellulare esaminata, e questa è espressa a livelli caratteristici per ciascuna linea cellulare.

4. Risultati

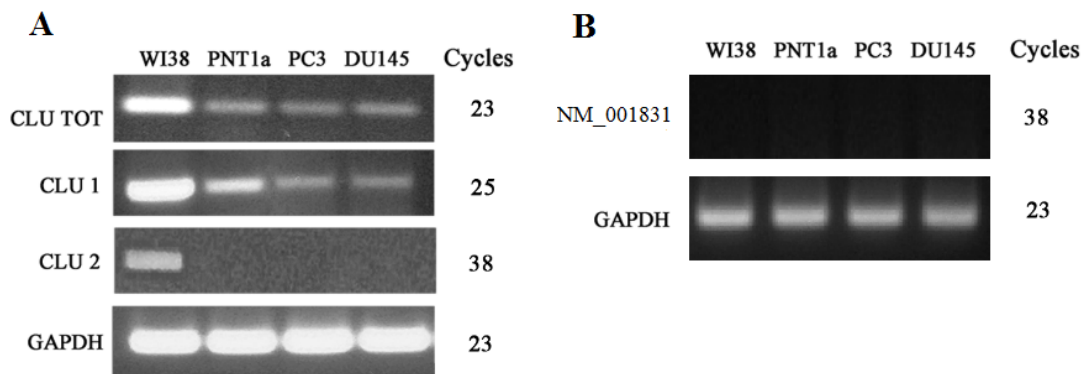


Fig.10 Espressione di CLU 1 e CLU 2 in fibroblasti e linee cellulari prostatiche.

A) Analisi semiquantitativa delle varianti trascrizionali CLU 1, CLU 2 e CLU TOT in cellule WI38, PNT1a, PC3 e DU145 mediante RT-PCR. Il numero dei cicli di PCR richiesti per ottenere un amplificato è inversamente proporzionale alla quantità totale di mRNA inizialmente presente nel campione. La GAPDH è stata utilizzata come gene housekeeper. **B)** Analisi semiquantitativa della variante NM_001831 condotta sulle stesse linee cellulari mediante RT-PCR. Il primer forward riconosce una porzione dell'esone 1a a monte della TATA box. La GAPDH è stata utilizzata come gene housekeeper. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

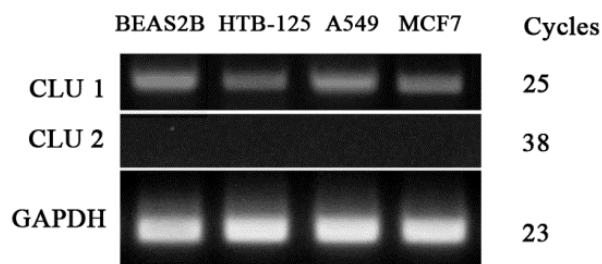


Fig.11 Espressione di CLU 1 e CLU 2 in linee cellulari di mammella e polmone.

Analisi semiquantitativa delle varianti trascrizionali CLU 1 e CLU 2 in BEAS2B, HTB-125, A549 e MCF7 mediante RT-PCR. Il numero dei cicli di amplificazione eseguiti in PCR riflette la quantità totale degli mRNA analizzati. La GAPDH è stata utilizzata come gene housekeeper. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

L'abbondanza relativa di CLU 1, CLU 2 e CLU TOT è stata valutata mediante qPCR nelle cellule epiteliali prostatiche rispetto alla quantità di CLU TOT presente nelle WI38 (Fig.12A). Come per la RT-PCR, anche in questo caso il primer forward utilizzato per valutare i livelli di espressione di CLU 1 appaia a valle della TATA box. L'analisi qPCR ha confermato il dato della minor espressione di CLU TOT nelle cellule epiteliali prostatiche rispetto alle WI38. I livelli di espressione di CLU 1 sono paragonabili ai livelli di espressione di CLU TOT, confermando che, almeno per le linee prese in esame, la variante trascrizionale che maggiormente contribuisce alla quantità totale dell'mRNA è CLU 1, a differenza di CLU 2 che è espressa a bassi livelli in tutte le linee cellulari testate. L'abbondanza relativa di CLU 2

è stata valutata nelle linee cellulari prostatiche rispetto alla quantità di CLU 2 presente nei fibroblasti (Fig.12B). Le PC3 sono risultate essere le cellule che esprimono i più bassi livelli di CLU 2, circa 10 volte di meno delle WI38. Nelle PNT1a e nelle DU145 i livelli di CLU 2 sono 5 volte inferiori rispetto a quelli rilevati nelle WI38.

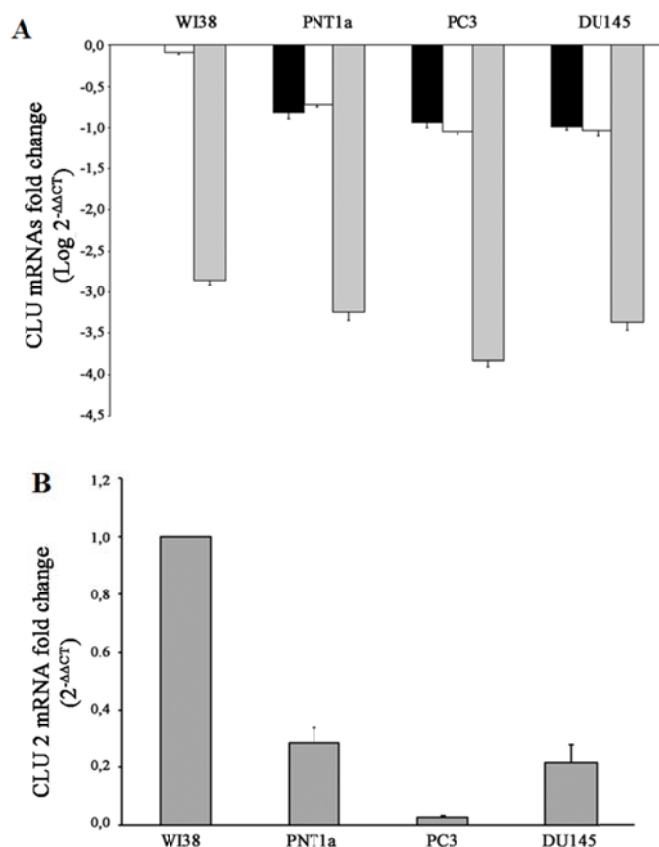


Fig.12 Analisi qPCR dei trascritti nei fibroblasti e nelle cellule epiteliali prostatiche.

A) Quantificazione delle varianti di mRNA di CLU mediante qPCR. CLU TOT= barre nere, CLU 1 = barre bianche, CLU 2 = barre grigie. L'espressione relativa dei trascritti è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione di espressione rispetto alla quantità di mRNA di CLU TOT presente nelle WI38 (riferimento fissato pari a 1). Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori delle variazioni espressi come $\text{Log } 2^{-\Delta\Delta C_t}$. **B)** Quantificazione relativa di CLU 2 calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione rispetto alla quantità di CLU 2 presente nelle WI38. Le barre d'errore rappresentano la DS di almeno tre determinazioni indipendenti. Tutti i risultati sono statisticamente significativi ($P < 0.001$).

In accordo con quanto osservato per i trascritti, l'analisi WB, condotta sia sul lisato intracellulare (icCLU) sia nel mezzo di coltura (extraCLU), ha rilevato che le cellule con i più alti livelli di espressione di CLU sono le WI38, mentre le cellule epiteliali prostatiche ne producono quantità inferiori (Fig.13). Nel lisato cellulare si osservano solo le bande corrispondenti al precursore di 64 kDa (psCLU) e alla forma matura di 40 kDa pronta per la secrezione (sCLU), mentre non sono presenti bande immunoreattive corrispondenti a forme

4. Risultati

intracellulari rare di CLU. Le PC3 secernono nel mezzo extracellulare la minor quantità di sCLU.

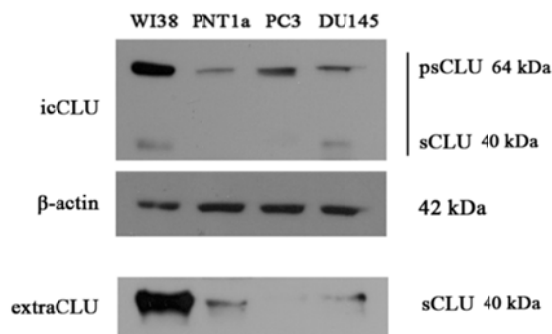


Fig.13 Analisi dei livelli di proteina di CLU in fibroblasti e cellule epiteliali prostatiche.

Determinazione dei livelli di CLU in cellule WI38, PNT1a, PC3 e DU145 mediante WB. L'analisi è stata condotta sia sul lisato intracellulare (icCLU) sia nei mezzi di coltura (extraCLU) utilizzando un anticorpo anti-CLU. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. psCLU = precursore di CLU, 64 kDa; sCLU = forma matura secreta o pronta per la secrezione, 40 kDa.

4.2 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU 1 E CLU 2 IN LINFOMI NON-HODGKIN TRATTATI CON FARMACI CHEMIOTERAPICI

Oltre ai tumori solidi, i livelli di espressione dei trascritti sono stati valutati in linee cellulari di linfomi non-Hodgkin sia in condizioni di controllo sia in seguito a somministrazione di chemioterapici. In particolare i livelli di CLU 1, CLU 2 e CLU TOT sono stati analizzati in cellule Toledo e OCI-LY 10 in seguito a trattamento con Rituximab 10 μ M (R10) o 100 μ M (R100) e con Doxorubicina 1 μ M (Doxo) (Fig.14). A differenza di quanto accade per i tumori solidi, in assenza di trattamento CLU 1 è virtualmente assente in entrambe le linee cellulari analizzate nonostante si sia utilizzato un primer forward che appaia a valle della TATA box presente nell'esone 1a. In seguito alla somministrazione di chemioterapici l'espressione di CLU 1 resta assente in cellule Toledo, mentre diventa rilevabile in OCI-LY 10 trattate con Doxo. CLU 2 è rilevabile in tutte le condizioni testate e rappresenta la variante maggiormente espressa in queste linee cellulari, con livelli di espressione approssimativamente paragonabili a CLU TOT. In seguito ai trattamenti con Rituximab non si osservano cambiamenti significativi dell'espressione di CLU 2 in entrambe le linee cellulari. Il trattamento Doxo determina un incremento di CLU 2, in particolar modo nelle OCI-LY 10.

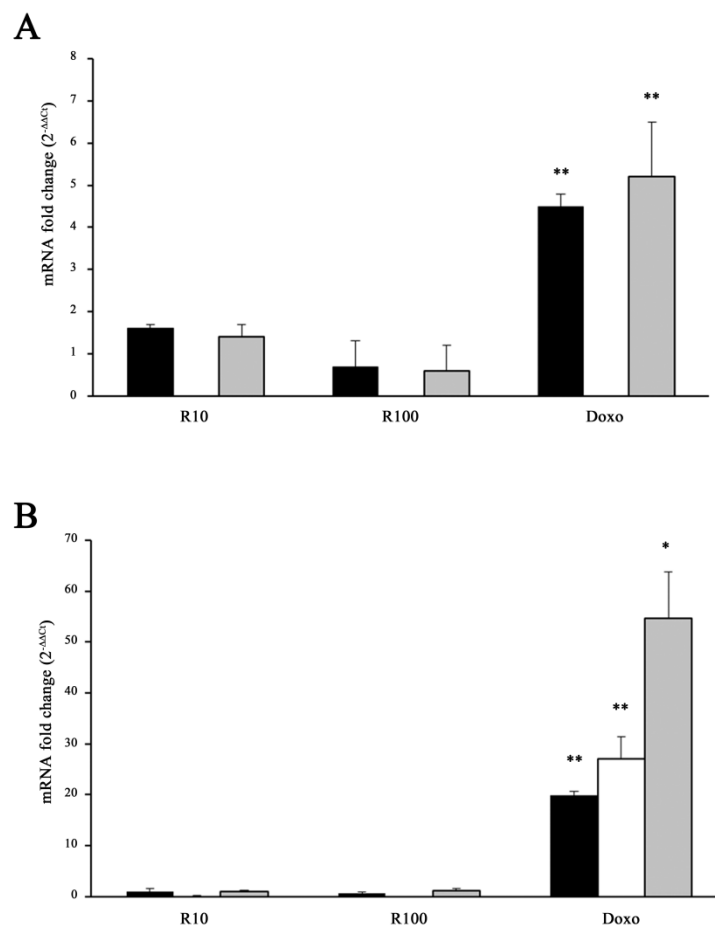


Fig.14 Analisi qPCR dei trascritti nelle cellule di linfoma non-Hodgkin.

Quantificazione delle varianti di mRNA mediante qPCR in cellule Toledo (A) e OCI-LY 10 (B). CLU TOT = barre nere, CLU 1 = barre bianche, CLU 2 = barre grigie. L'espressione relativa di ogni variante dopo i trattamenti è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione di espressione rispetto alla stessa variante in condizioni di controllo (riferimento fissato pari a 1). Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

4.3 LA PROTEINA ORIGINATA DAL TRASCritto CLU 2

Le informazioni riportate in letteratura in merito al trascritto CLU 2 e alla proteina che da esso si può generare, riguardano esclusivamente analisi computazionali e non è disponibile alcun dato sperimentale né *in vitro* né *in vivo*. Sulla base di una predizione bioinformatica, NCBI assegna la definizione di mRNA non codificante al trascritto CLU 2, a causa della presenza di una ORF a monte di quella principale che interferirebbe con la traduzione. Tra tutte le linee cellulari analizzate, le Toledo hanno la caratteristica peculiare di non esprimere la variante trascrizionale CLU 1, mentre è espressa la variante trascrizionale CLU 2 in tutte le condizioni testate. Per questo motivo sono state scelte come modello cellulare per valutare se il trascritto CLU 2 è tradotto in proteina ed eventualmente studiarne le caratteristiche. A differenza di quanto riportato in NCBI, l'analisi WB condotta sul lisato cellulare totale in

4. Risultati

assenza di trattamento (None, lane T) rileva la presenza di due bande immunoreattive corrispondenti al precursore (psCLU) e alla forma matura pronta per la secrezione (sCLU) (Fig.15). In seguito alla somministrazione di Rituximab e di Doxorubicina, le uniche forme proteiche rilevabili sono psCLU e a sCLU e non si rilevano bande immunoreattive corrispondenti a forme intracellulari di differente peso molecolare (R10, R100, Doxo 0.1, Doxo 1, lane T).

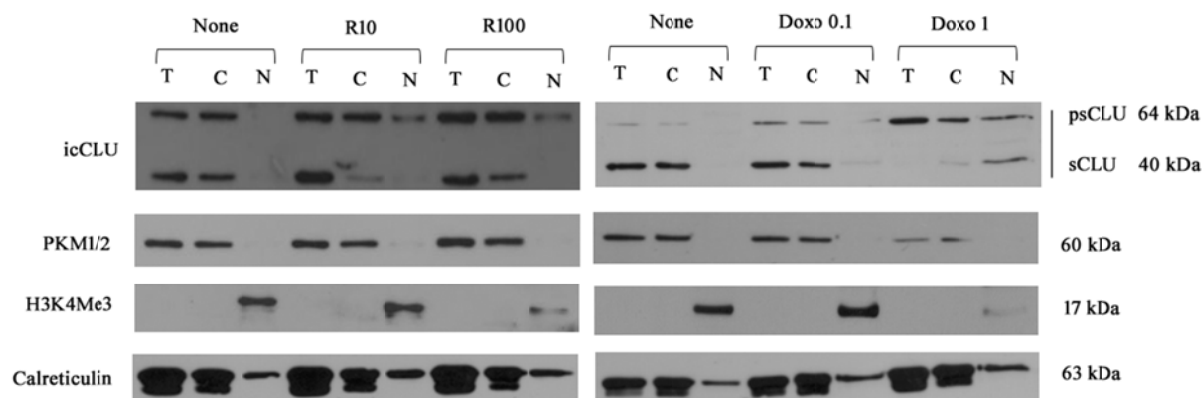


Fig.15 Localizzazione della proteina derivante da CLU 2.

Localizzazione intracellulare di CLU (psCLU e sCLU) dopo frazionamento cellulare in Toledo non trattate (None) o trattate con Rituximab 10 μ M (R10) o 100 μ M (R100), Doxorubicina 0.1 μ M (Doxo 0.1) o 1 μ M (Doxo 1) mediante WB. PKM1/2, H3K4Me3, Calreticulin sono stati utilizzati come marker rispettivamente della frazione citosolica, nucleare e del RE. T = lisato totale; C = frazione citosolica/RE; N= frazione nucleare.

Al fine di verificare la localizzazione cellulare della proteina prodotta, le cellule Toledo non trattate e trattate con Rituximab e Doxorubicina, sono state sottoposte a frazionamento cellulare per separare le proteine nucleari da quelle citosoliche e del RE. La purezza delle singole frazioni è stata testata valutando la presenza di proteine tipiche del compartimento citosolico, del RE e del nucleo. Sono stati scelti la piruvato chinasi isoenzima M1 e M2 (PKM1/2) come marker citosolico, la calreticulina (calreticulin) come marker del RE e infine l'istone H3 lisina 4 trimetilato (H3K4Me3) come marker nucleare. La frazione citosolica/RE è pura, mentre la frazione nucleare risulta parzialmente contaminata dalle membrane del RE (Fig.15). Dal frazionamento cellulare si può notare come, in assenza di trattamento, sia psCLU sia sCLU abbiano una localizzazione citosolica/RE (None, lane C). In seguito a trattamenti, in particolare Doxo 1 μ M, una piccola quantità di CLU si trova nella frazione nucleare (Doxo 1, lane N), ma tale quantità è compatibile con la leggera contaminazione della frazione nucleare con proteine del RE. Pertanto si può affermare che la somministrazione dei chemioterapici, oltre a non modificare il profilo d'espressione proteico, non modifica la

localizzazione cellulare della proteina derivante dal trascritto CLU 2, che rimane principalmente citosolica, confinata per lo più al comparto secretorio.

4.4 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU 1 E CLU 2 IN CELLULE TUMORALI PROSTATICHE TRATTATE CON FARMACI EPIGENETICI

Al fine di verificare come l'espressione delle varianti trascrizionali di CLU vari in base alla somministrazione di farmaci epigenetici, è stata valutata mediante qPCR l'espressione relativa di CLU 1, CLU 2 e CLU TOT in cellule epiteliali prostatiche tumorali PC3 e DU145 trattate con TSA 1 μ M (TSA) o con la combinazione di AZDC 10 μ M e TSA 1 μ M (AZDC-TSA) (Fig.16A). Il trattamento TSA, ma soprattutto il trattamento combinato AZDC-TSA, determina un aumento dell'espressione di tutti i trascritti. Prendendo come riferimento l'espressione di ogni variante trascrizionale nelle cellule non trattate, l'aumento dell'espressione di CLU 2 rilevato in seguito ai trattamenti è sempre maggiore dell'aumento dell'espressione di CLU 1, soprattutto nelle cellule DU145 sottoposte al doppio trattamento AZDC-TSA.

Coerentemente all'aumento dei trascritti si osserva, per entrambe le linee cellulari, un incremento dei livelli di proteina sia intracellulare (icCLU) sia rilasciata nell'ambiente extracellulare (extraCLU) (Fig.16B). Nella frazione intracellulare si evidenzia un aumento dell'espressione sia del precursore (psCLU) sia della forma matura pronta per la secrezione (sCLU) e in nessuna delle condizioni testate sono presenti bande immunoreattive corrispondenti a forme rare della proteina.

La localizzazione della proteina è stata valutata mediante analisi immunocitochimica in fluorescenza in cellule PC3 e DU145 utilizzando un anticorpo primario rivolto contro CLU. In seguito ai trattamenti si evidenzia un aumento della fluorescenza che rimane tuttavia sempre confinata al compartimento citosolico (Fig.16C).

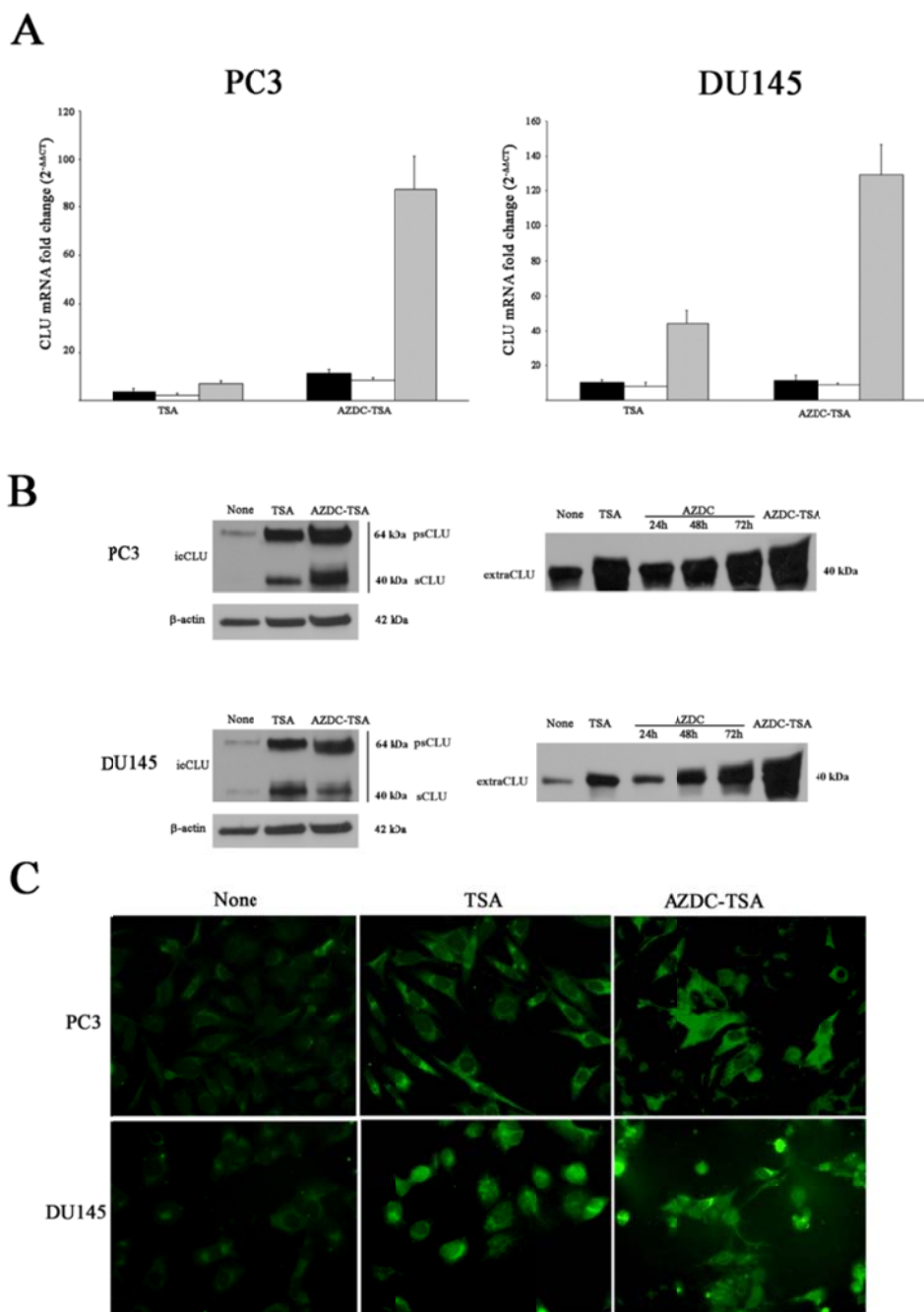


Fig.16 Effetti dei farmaci epigenetici sull'espressione di CLU in linee cellulari tumorali prostatiche.

A) Quantificazione delle varianti di mRNA mediante qPCR in PC3 e DU145. CLU TOT = barre nere, CLU 1 = barre bianche, CLU 2 = barre grigie. L'espressione relativa di ogni variante dopo i trattamenti è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ come variazione d'espressione rispetto alla stessa variante in condizioni di controllo (riferimento fissato pari a 1). Le barre d'errore rappresentano la DS di 4 determinazioni indipendenti. Tutti i risultati sono statisticamente significativi ($P < 0.01$). **B)** Determinazione dei livelli di CLU in PC3 e DU145 non trattate (None) o trattate con TSA 1 μ M per 24 ore (TSA) o con AZDC 10 μ M per 72 ore, seguito da TSA 1 μ M per 24 ore (AZDC-TSA) mediante WB. L'analisi è stata condotta sia sul lisato intracellulare (icCLU) sia nei mezzi di coltura (extraCLU) utilizzando un anticorpo anti-CLU. La β -actina è stata usata come controllo del caricamento. psCLU = precursore di CLU, sCLU = forma matura secreta o pronta per la secrezione. **C)** Analisi immunocitochimica utilizzando un anticorpo anti-CLU (fluorescenza verde) in PC3 e DU145 non trattate (None) e trattate (TSA e AZDC-TSA). L'esperimento è stato ripetuto in triplicato. Immagini acquisite con ingrandimento 20X.

La somministrazione di TSA e AZDC-TSA induce nelle cellule una differente risposta: le PC3 sono più resistenti al trattamento mentre le DU145 risultano più sensibili. Mediante microscopia a contrasto di fase si può osservare come le DU145 perdano la loro tipica morfologia, si arrotondino e tendano a staccarsi dal supporto di crescita (Fig.17A).

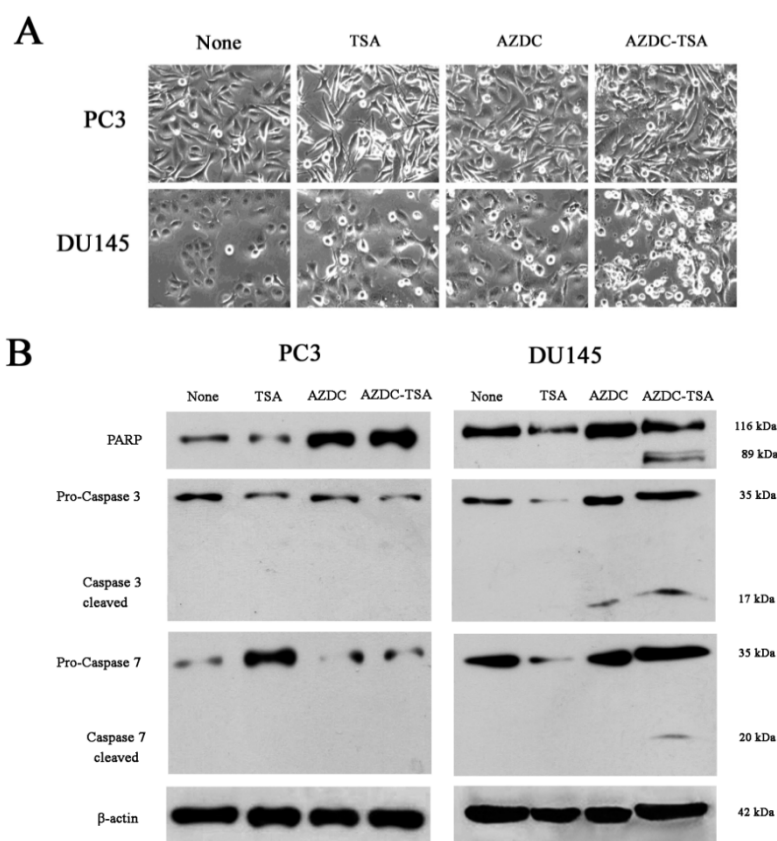


Fig.17 Alterazioni morfologiche indotte da farmaci epigenetici in cellule prostatiche tumorali.

A) Analisi della morfologia di PC3 e DU145 non trattate (None) o trattate con TSA 1 μ M per 24 ore (TSA) o con AZDC 10 μ M per 72 ore (AZDC) o con AZDC 10 μ M per 72 ore, seguito da TSA 1 μ M per 24 ore (AZDC-TSA) mediante microscopia a contrasto di fase. Immagini acquisite con ingrandimento 20X. **B)** Analisi dell'espressione proteica dei marcatori di apoptosi PARP, caspasi 3 e 7 in condizioni basali (None) e dopo trattamento TSA, AZDC e AZDC-TSA mediante WB. La β -actina è stata usata come controllo del caricamento. Pro-Caspase = forma inattiva, Caspase cleaved = forma attiva.

In particolar modo dopo il trattamento combinato, si osserva con la frequente comparsa di cellule plurinucleate e una frammentazione cellulare senza rilascio di citoplasma, evento caratteristico della morte per apoptosi. Per verificare tale ipotesi, si è analizzata la presenza di marker tipici dell'apoptosi, quali le forme attive di poli(ADP) ribosio polimerasi-1 (PARP), caspasi 3 e 7 (Fig.17B). PARP è un enzima attivato in risposta al danno al DNA che ha un

4. Risultati

ruolo chiave nella riparazione delle rotture a singolo filamento. Durante l'apoptosi, le caspasi 3 e 7 inattivano PARP scindendola in due frammenti di 27 e 89 kDa. Le caspasi 3 e 7 sono sintetizzate come pro-enzimi e la loro attivazione avviene ad opera di caspasi iniziatrici, all'inizio della cascata apoptotica. Nelle DU145 sottoposte a trattamento AZDC-TSA, si osservano le forme attive delle caspasi 3 e 7, nonché della PARP. Al contrario, nelle PC3, dove non si osservano grossi cambiamenti di morfologia, sono presenti solamente le pro-forme dei marker apoptotici, ma non le forme attive.

Poiché in letteratura è riportato che CLU è coinvolta nel processo apoptotico, si è testata l'ipotesi che essa potesse essere direttamente coinvolta nella regolazione della morte cellulare indotta dai farmaci epigenetici. Per verificare tale ipotesi si è misurata la vitalità cellulare di PC3 e DU145 sottoposte a trattamento con TSA e AZDC-TSA, in cellule preventivamente trasfettate con siRNA CLU, che riconosce una sequenza comune a tutte le varianti trascrizionali. Come controllo dell'esperimento sono state utilizzate cellule trasfettate con un siRNA universale non silenziante (NC). Dopo aver verificato tramite WB l'effettivo silenziamento di CLU (Fig.18A), è stato condotto il saggio di vitalità cellulare WST-1 (Fig.18B). Il trattamento con TSA e AZDC-TSA, riduce la vitalità di entrambe le linee cellulari, indipendentemente dalla presenza di CLU.

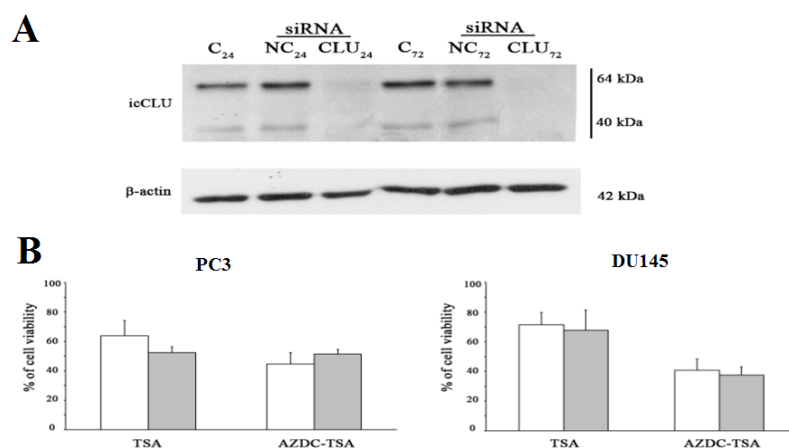


Fig.18 Analisi degli effetti del silenziamento di CLU sulla vitalità cellulare.

A) Determinazione dei livelli di CLU nel lisato intracellulare (icCLU) di cellule PC3 trasfettate con siRNA CLU o NC mediante WB. L'analisi è stata condotta dopo 24 e 72 ore dalla trasfezione. La β -actina è stata usata come controllo del caricamento. C = cellule non trasfettate, NC = siRNA NC, CLU = siRNA CLU. **B)** Analisi della vitalità cellulare mediante saggio WST-1 condotta in PC3 e DU145 trasfettate con siRNA NC (barre bianche) o siRNA CLU (barre grigie) e trattate con TSA 1 μ M per 24 ore (TSA) o con AZDC 10 μ M per 72 ore, seguito da TSA 1 μ M per 24 ore (AZDC-TSA). Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti.

PARTE 2

LE REGIONI REGOLATRICI DEL GENE

4.5 ANALISI IN SILICO DEI TSS E DELLE PUTATIVE REGIONI REGOLATORIE DI CLU

L'esistenza di due varianti trascrizionali che differiscono nella porzione al 5', espresse a diversi livelli in varie linee cellulari e differientemente indotte da farmaci, suggerisce la possibilità che possano avere origine da TSS differenti regolati da regioni promotrici differenti. Per verificare tale ipotesi, è stata condotta un'analisi *in silico* con il software MatInspector interrogando il programma per i probabili mRNA, TSS e regioni promotrici del gene. È stata sondata una porzione di DNA che comprende 2000 pb a monte e a valle del TSS dell'inizio del gene. Dall'analisi è emersa la presenza di due TSS nella 5'-UTR del gene corrispondenti all'inizio dell'esone 1a (TSS1) e dell'esone 1b (TSS2). Sono state anche identificate due putative regioni promotrici, denominate P1 e P2 in questo lavoro di tesi (Fig.19). P1 si estende da -499 a +212 pb rispetto al TSS1 e corrisponde al promotore descritto da Wong e collaboratori nel 1994¹³. Esso contiene, oltre alla TATA box, il "motif ten element" (MTE), una sequenza di riconoscimento per il macchinario di trascrizione dell'RNAPolimerasi II. P2 è invece una regione regolatoria mai caratterizzata prima, ricca in GC e priva della TATA box. Essa è composta da 601 pb e si estende da -484 a +117 pb rispetto al TSS2.

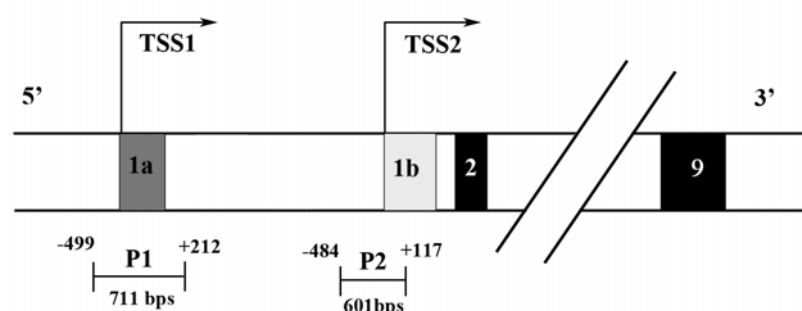


Fig.19 Analisi *in silico* del gene CLU.

Rappresentazione grafica della predizione delle regioni promotrici di CLU condotta con il programma MatInspector. 1a e 1b rappresentano gli esoni unici presenti nelle varianti trascrizionali CLU 1 e CLU 2; TSS1 e TSS2 rispettivamente i siti d'inizio trascrizione di CLU 1 e CLU 2. P1 = promotore 1, P2 = promotore 2.

4. Risultati

Dopo aver indentificato due putative regioni regolatorie con il software MatInspector, lo stesso programma è stato utilizzato per valutare i motivi di legame per fattori di trascrizione presenti in tali regioni. La ricerca è stata condotta utilizzando criteri per la “core similarity” e la “matrix similarity” molto restrittivi in modo che il programma restituisse in output solo i risultati altamente probabili. Questi due parametri sono indicativi del grado di corrispondenza tra la sequenza inserita in input e le sequenze consenso canoniche riconosciute dai fattori di trascrizione. I criteri impostati per l’analisi sono pari a 1 per la “core similarity” e di almeno 0.8 per la “matrix similarity”.

La prima analisi è stata condotta su P1 e ha rilevato la presenza di motivi riconosciuti da fattori di trascrizione come AP1, SP1, la proteina CCAAT-enhancer-binding protein (CEBP) (Fig.20A). Alcuni dei motivi di legame identificati con l’analisi *in silico* sono stati testati sperimentalmente in passato mediante saggi funzionali da altri gruppi di ricerca come il motivo HSE riconosciuto dall’HSF.

Con gli stessi criteri di ricerca è stata condotta l’analisi di P2 che ha rilevato la presenza di motivi di legame per fattori tipici del macchinario basale di trascrizione, quali SP1, il fattore nucleare I (NFI) e Ying Yang 1 (YY1) (Fig.20B). Inoltre, sono stati individuati motivi di legame per fattori di trascrizione che hanno un ruolo chiave nello sviluppo, nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, quali NF-kB, il fattore Basic helix-loop-helix protein 37 (MYCN) e la proteina Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Come precedentemente indicato, NF-kB è un fattore trascrizionale coinvolto nell’infiammazione che ha un ruolo nel processo di metastatizzazione del tumore. MYCN è un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo del cervello, la cui deregolazione è frequentemente osservata nel neuroblastoma. I membri della famiglia STAT controllano la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare e il pathway è frequentemente alterato nei tumori primari. In aggiunta è stato trovato il motivo di legame per il fattore di trascrizione Sry-like HMG box gene 2 (SOX2), che è coinvolto nel mantenimento della pluripotenza delle cellule embrionali indifferenziate e il sito di legame per il repressore delle apolipoproteine, Apolipoprotein Repressor Protein-1 (ARP-1). Questi ultimi due sono motivi di legame caratteristici della sequenza di P2 che non sono stati ritrovati nella sequenza di P1.

A**CLU P1 sequence**

- 499 ACCCCGAGAGGCCTTCTGGCTCTCCACATATCTGCTCTGATCACTCCTAAACACAATTC
- 439 TGTTTCTCCAGGCCTGGCGGGTCAGTCCAGGGACCCCCATCAGTGTGATGTTTCCAGGA
- 379 GTAGGCGTTTCAATACTTCTGTGCTCTTCTCCAGCACAAGGCCCTCTCCATCCCACC
- 318 CTCATTATGTCTGACTCTTTACTATTTAAATGGGTCAAGAGAAAGTGGCGCTTGTGTAATG
CEBP
- 258 TGAAGTTAAGGTCAAGTCCAGTGGGCCAGGGAAGTGTGAGATTGTGCTTGGACTGGGACAGA
- 199 CAGCCGGCTAACCGCGTGAGAGGGGCTCCAGATGGGCACGCGAGTTCAGGCTCTTCC
- 140 CTAAGGAAAGCGCCGAGCGGCCACCTCAGGGTCTCTCTGGAGCCAGCACAGCTATT
MTE
- 81 CGTGGTGATGATGCGCCCCCGCGCCCCAGCCGGTGTGCACCGGCCCCACCTCCC
+1
└─▶
- 21 GGCTTCCAGAAAGCTCCCCTTGCTTCCGCGGCATTCTTTGGGCGTGAGTCATGCAAGTT
HSF API
+ 39 TGCAGCCAGCCCCAAAGGGGGTGTGTGCGCGAGCAGAGCGCTATAAATACGGCGCTCC
SPI MTE TATA box
+ 98 CAGTGCCACAACGCGGCGTCCAGGAGGAGCGCGGGCACAGGGTCCGCTGACC

B**CLU P2 sequence**

- 484 TCTCTGGCATGACAAAGGCTCTGTTCCTGCTGGAGGCATTCAGGGCTCAGTGGGCAGCT-
SOX2 ARP-1
- 424 GGGGACAGAGCCCGTGAGACCACAGCCTTCTGGTGAGCCGGTCTCCGCCCCCTACCCCA
- 364 TCTCTGGGAAGGCGCTGACCCATCTCTCTCCACGCTGCTCCCTGGCTCTTTGCGCCT
- 303 GATTACTTCTCATGAGAGGCACTCCTTGTTAATGTGCTACTGAGGTCCAGATGGGCCTGC
- 242 TGGGCTGAGCGGGCTTTGGATGTGAACCATTCAGGAAGGGGAACCCATCGTCTGTGTG
YY1 STAT NFKB
- 182 GTTCTGTGATGGCAAATGGGTGAGCTCAGATAAGCAGTTCTTGGGAGGGGCATGGTGGGG
SPI
- 122 GTGGAGTGCAGGGGGAGGGGTTTCTGTTTTAIGCAACAGCCTCAGCTTCTGGGAAAGGGT
SPI STAT
- 62 CCATTGTGTAAGACCGGGGCTATGGCCTGTGCCCCGTGGCTCAGGGCAGCCAGCCAGTGC
MYCN
- 2 GTGGCAGGAACACTGGCAGGGCAGCCTGTGTCGGCTTAGAGGGGATGGGCAGTGTGGA
NFI
+ 57 GGGCCTGGCAGAGCAAGAGGACTCAICCTTCCAAAGGGACTTTCTCTGGGAAGCCTGCTC

Fig.20 Sequenza nucleotidica di P1 e P2.

A) Sequenza di P1 identificata con il software MatInspector. Sono stati sottolineati i putativi siti di legame per fattori di trascrizione. A sinistra la posizione dei nucleotidi rispetto al TSS. TSS = +1. **B)** Sequenza di P2 identificata con il software MatInspector. Sono stati sottolineati i putativi siti di legame per fattori di trascrizione. A sinistra la posizione dei nucleotidi rispetto al TSS. TSS = +1.

4.6 ATTIVITÀ DEL PROMOTORE P2

Per provare la funzione regolatrice della sequenza P2 è stato condotto un esperimento d'immunoprecipitazione della cromatina utilizzando un anticorpo anti-TBP. È stata scelta la TBP poiché è noto che essa è un componente necessario per l'assemblaggio del complesso di pre-inizio della trascrizione che riconosce e lega la regione del promotore prossimale di un gene eucariote indipendentemente dalla presenza della TATA box. Pertanto la presenza di TBP legata a sequenze del DNA genomico è altamente predittiva della presenza di un promotore. Al fine di verificare se tra le sequenze di DNA genomico legate dalla TBP sono presenti anche le sequenze corrispondenti a P1 e P2 e condurre un'analisi quantitativa, i frammenti di DNA immunoprecipitati insieme alla TBP sono stati saggiati in qPCR utilizzando coppie di primer specifiche in grado di amplificare selettivamente la sequenza di P1 o di P2. I dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo della percentuale dell'input che permette di valutare l'arricchimento in una specifica sequenza di DNA immunoprecipitata con la proteina d'interesse rispetto alla quantità di DNA inizialmente presente all'interno del campione. L'analisi è stata condotta in PC3 e DU145 confrontando l'occupazione delle sequenze corrispondenti a P1 e P2 da parte della TBP in condizioni di controllo e dopo la somministrazione combinata di AZDC-TSA (Fig.21A). L'analisi qPCR eseguita sul DNA immunoprecipitato mostra un arricchimento nelle sequenze di DNA corrispondenti a P1 e a P2 nella cromatina immunoprecipitata con TBP già in condizioni di controllo. La somministrazione di AZDC-TSA non produce lo stesso effetto sulle due linee cellulari, infatti, in PC3 l'arricchimento in TBP, sia su P1 sia su P2, è alto in cellule non trattate e la somministrazione di AZDC-TSA non aumenta in modo significativo tale arricchimento. Al contrario, in DU145 non trattate i livelli di occupazione della TBP in corrispondenza della sequenza di P2 sono bassi e aumentano di circa 6 volte in seguito al trattamento combinato AZDC-TSA.

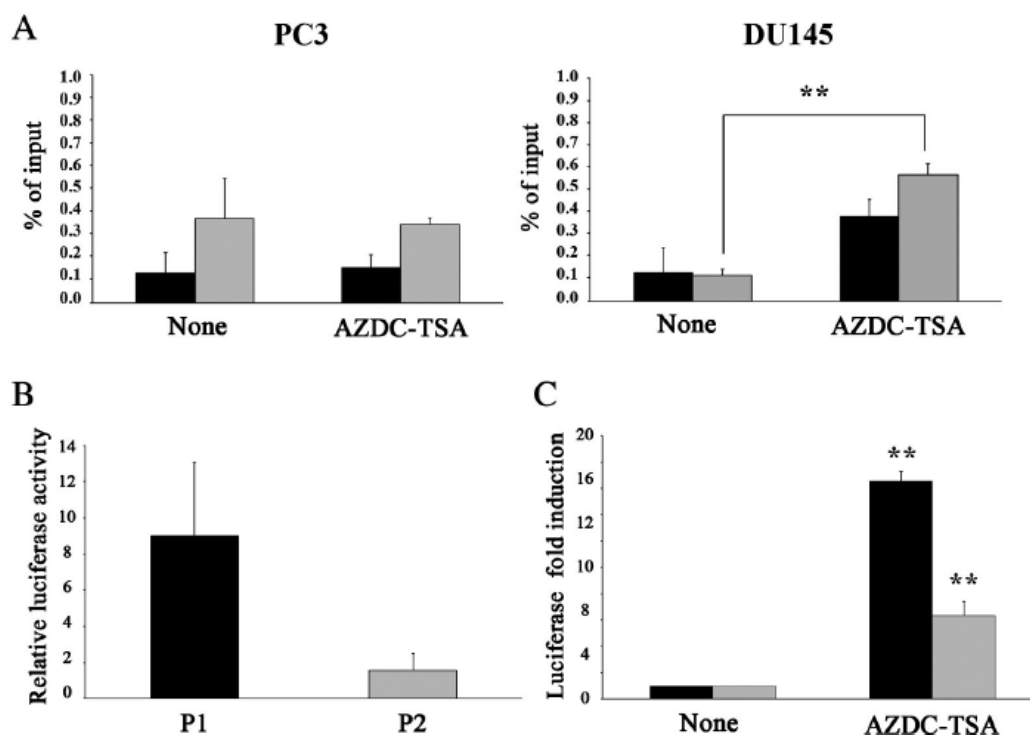


Fig.21 Attività dei promotori P1 e P2.

A) Occupazione delle sequenze P1 e P2 da parte della TBP in cellule PC3 e DU145 non trattate (None) e trattate con AZDC 10 μ M per 72 ore, seguito da TSA 1 μ M per 24 ore (AZDC-TSA) valutata mediante saggio di ChIP. I frammenti di DNA immunoprecipitati con la TBP sono stati analizzati in qPCR e l'arricchimento della TBP è stato calcolato con il metodo della % di input. **B)** Le cellule PC3 sono state trasfettate con il plasmide reporter con la luciferasi in cui sono state clonate le sequenze di P1 e P2. L'attività della luciferasi è stata valutata rispetto al plasmide reporter privo di promotore e i valori sono stati normalizzati per il contenuto di proteine. **C)** I costrutti di luciferasi P1 e P2 sono stati trasfettati in cellule PC3 sottoposte a trattamento AZDC-TSA. L'attività della luciferasi è stata valutata rispetto a quella misurata nelle cellule PC3 non trattate (None) il cui valore è stato fissato pari a 1. Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti. P1 = barre nere, P2 = barre grigie (** $P < 0.01$).

Per valutare se le sequenze P1 e P2 sono effettivamente capaci di regolare l'attività trascrizionale, le stesse sono state clonate nel plasmide reporter privo di promotore a monte del gene che codifica per l'enzima luciferasi, la cui attività è rilevabile con un saggio in luminescenza. I costrutti così ottenuti, sono stati trasfettati in cellule PC3 e l'attività della luciferasi è stata valutata sia in cellule non trattate (Fig.21B) sia in seguito al trattamento combinato AZDC-TSA (Fig.21C). In assenza di trattamento, l'attività trascrizionale di P2 è irrilevante se confrontata con l'attività di P1, ma in seguito alla somministrazione di AZDC-TSA si osserva un incremento significativo dell'attività di P2. Il trattamento, oltre ad indurre un aumento d'attività di P2, determina un incremento significativo dell'attività di P1.

4.7 STATO DI METILAZIONE DELL'ISOLA CpG

Al fine di capire il/i meccanismi che regolano l'incremento dell'attività dei promotori P1 e P2 in seguito alla somministrazione di farmaci epigenetici, si è valutato lo stato di metilazione del DNA a monte del gene di CLU. Mediante l'utilizzo del software MethPrimer si è analizzata una porzione di DNA di 6000 pb attorno al TSS1 in modo da comprendere sia P1 sia P2 (Fig.22A). Il programma ha rilevato la presenza di un'unica isola CpG localizzata nel promotore P1 e nella porzione 5' dell'esone 1a. Lo stato di metilazione dell'isola CpG individuata con il software, è stato analizzato in WI38, PC3 e DU145 con la tecnica MSP-PCR, che utilizza dei primer specifici capaci di discriminare tra DNA metilato e non metilato (Fig.22B, pannello superiore). Nelle WI38, le cellule che esprimono la maggior quantità di CLU in termini di trascritto e di proteina (Fig.12 e Fig.13), l'isola CpG non è metilata, nelle PC3 è metilata, mentre le DU145 mostrano una situazione di parziale metilazione. Quando alle cellule PC3 e DU145 è somministrato AZDC o la combinazione AZDC-TSA non si osservano cambiamenti nello stato di metilazione dell'isola CpG del promotore P1 (Fig.22B, pannello inferiore).

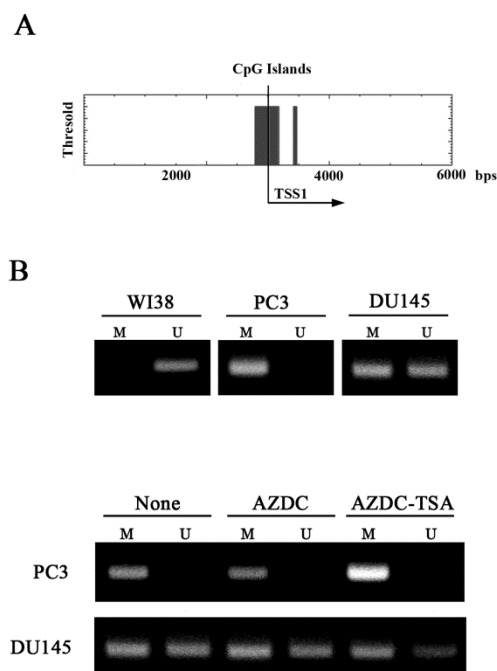


Fig.22 Analisi dell'isola CpG nella regione al 5' del gene di CLU e MSP-PCR.

A) Rappresentazione grafica della localizzazione dell'isola CpG condotta nell'intorno del TSS1 di CLU (6000 pb) predetta con il software MethPrimer. La freccia indica il TSS1, mentre il rettangolo grigio indica l'isola CpG predetta. **B)** Analisi dello stato di metilazione del DNA condotta su WI38, PC3 e DU145 in condizioni basali (pannello superiore) mediante MSP-PCR. La stessa analisi è stata condotta in PC3 e DU145 dopo la somministrazione di AZDC 10 μ M per 72 ore (AZDC) o di AZDC 10 μ M per 72 ore, seguito da TSA 1 μ M per 24 ore (AZDC-TSA) (pannello inferiore). M = DNA metilato (methylated), U = DNA non metilato (unmethylated).

4.8 STATO DELLE MODIFICAZIONI DELLE CODE ISTONICHE IN CELLULE TRATTATE CON I FARMACI EPIGENETICI

Dal momento che la metilazione diretta del DNA non sembra essere il meccanismo responsabile dell'induzione a breve termine di CLU in seguito alla somministrazione di farmaci epigenetici, si è ipotizzato che la causa potesse essere la modificazione degli istoni associati alla cromatina nella regione corrispondente a P1 e P2. A tal fine è stata eseguita l'immunoprecipitazione della cromatina utilizzando un anticorpo anti-H3K9ac (Fig.23A) e un anticorpo anti-H3K27me3 (Fig.23B). L'acetilazione della lisina 9 dell'istone H3 è una modificazione della cromatina solitamente associata ad uno stato trascrizionalmente attivo, mentre la trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 è associata ad un stato di repressione trascrizionale. Per valutare se tali modificazioni sono associate ai promotori e se variano in seguito al trattamento con farmaci epigenetici, si è confrontata la cromatina estratta dalle cellule PC3 e DU145 in condizioni di controllo e la cromatina estratta dalle cellule che hanno subito il trattamento combinato AZDC-TSA. L'analisi qualitativa e quantitativa delle sequenze di DNA immunoprecipitate insieme all'istone H3 modificato sulla lisina 9 o sulla lisina 27 è stata eseguita tramite qPCR utilizzando coppie di primer specifiche per le sequenze di P1 e di P2 e i dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo della percentuale dell'input. L'analisi qPCR eseguita sul DNA immunoprecipitato con H3K9ac mostra un blando arricchimento nelle sequenze di DNA corrispondenti a P1 e a P2 in assenza di trattamento. In seguito alla somministrazione di AZDC-TSA si nota un aumento dell'arricchimento in H3K9ac associato a P1 in cellule PC3, mentre non vi è alcuna variazione nelle DU145. A livello della sequenza di P2 si osserva un incremento dell'arricchimento in H3K9ac associato al DNA pari a 3 volte nelle PC3 e a 7 volte nelle DU145 rispetto alle cellule non trattate. In entrambe le linee cellulari l'analisi qPCR condotta sul DNA immunoprecipitato con H3K27me3 evidenzia un alto livello di arricchimento nelle sequenze di DNA corrispondenti a P1 e a P2 in assenza di trattamento. La somministrazione di AZDC-TSA riduce significativamente la quantità di H3K27me3 legato alle sequenze di P1 e P2 solo nelle DU145, mentre nelle PC3 non si hanno cambiamenti significativi.

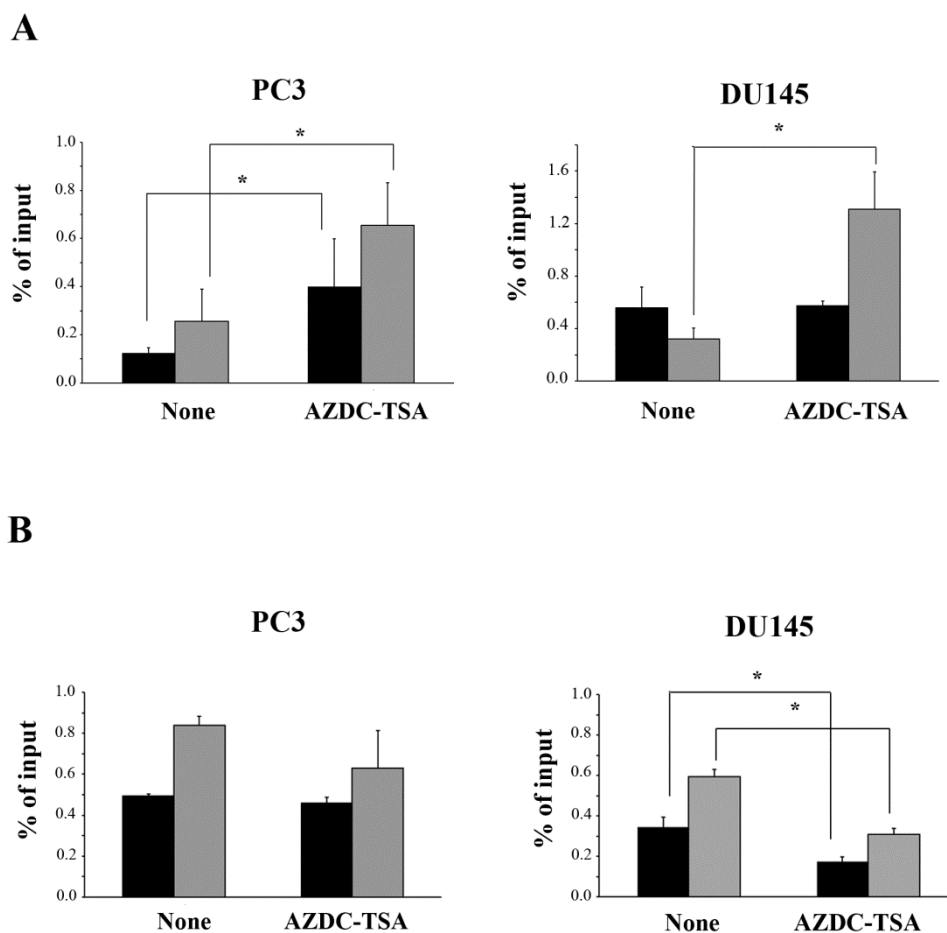


Fig.23 Analisi delle modifiche della coda dell'istone H3 a livello dei promotori di CLU dopo trattamento con farmaci epigenetici.

Immunoprecipitazione della cromatina condotta con anticorpo anti-H3K9ac (**A**) e anti-H3K27me3 (**B**) in cellule PC3 e DU145 in condizioni basali (None) e dopo trattamento con AZDC 10 μ M per 72 ore, seguito da TSA 1 μ M per 24 ore (AZDC-TSA). I frammenti di DNA immunoprecipitati sono stati analizzati in qPCR utilizzando primer specifici per P1 e per P2. L'arricchimento delle modificazioni istoniche è stato calcolato con il metodo della % di input. P1 = barre nere, P2 = barre grigie. Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti (* $P < 0.05$).

PARTE 3

IL RUOLO DI CLU NEL PATHWAY DI NF- κ B

4.9 LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLU E p65 IN BIOPSIE UMANE DI PROSTATA

I livelli di trascritto di CLU e di p65 in tessuto prostatico umano sono stati acquisiti avvalendosi dei dati di un recente studio microarray depositato nel database GEO2R con l'identificativo GSE6919. Le biopsie dei pazienti oggetto dello studio sono state classificate in 4 gruppi sulla base della diagnosi istologica: tessuto normale, tessuto normale adiacente al tumore, PCa primari e metastasi. L'analisi dei livelli di espressione genica eseguita sulle varie tipologie di tessuto, rivela come nei tumori primari e nelle metastasi vi sia una diminuzione significativa dei livelli di CLU rispetto al tessuto prostatico normale. L'espressione di CLU invece rimane invariata se si confronta il tessuto normale con il tessuto sano adiacente al tumore (Fig.24, pannello sinistra). Al contrario, i livelli d'espressione genica di p65 non variano nei PCa primari rispetto al tessuto prostatico normale, mentre aumentano nei tumori metastatici (Fig.24, pannello destra). Nelle fasi tardive della progressione del PCa (metastasi), pertanto, si osserva una regolazione differenziale di CLU e di p65 e i livelli di p65 sono più elevati in concomitanza con la riduzione dell'espressione di CLU.

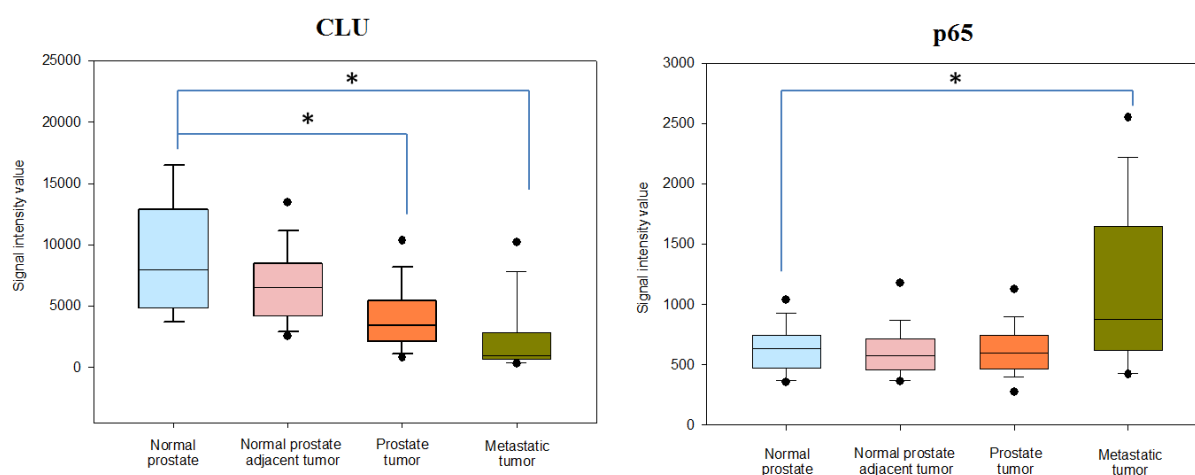


Fig.24 Espressione di CLU e p65 in campioni di PCa.

Box plot dei valori di espressione genica di CLU (pannello di sinistra) e p65 (pannello di destra) in campioni di prostata sana (Normal prostate), di tessuto normale adiacente al tumore primario (Normal prostate adjacent tumor), PCa primario (Prostate tumor) e di metastasi (Metastatic tumor) (* $P < 0.05$).

4.10 CARATTERIZZAZIONE DI CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU

Dal momento che nelle fasi tardive del PCa si osserva una down-regolazione di CLU in concomitanza ad una up-regolazione di p65, si è ipotizzato che CLU possa svolgere un ruolo diretto o indiretto nella regolazione del signaling di NF- κ B. Al fine di verificare tale ipotesi, cloni stabili sovraesprimenti CLU sono stati ottenuti trasfettando le cellule PC3 con il plasmide d'espressione pIRES in cui è stata clonata la CDS di CLU a partire dal secondo esone (pIRES-CLUfull). In seguito a selezione clonale sono stati isolati 14 cloni sovraesprimenti (PC3_{CLU}). In parallelo, con la stessa procedura, sono stati generati e isolati 10 cloni di controllo (PC3_{mock}) trasfettati con il plasmide pIRES-mock. Oltre alla selezione di singoli cloni è stata raccolta una popolazione policlonale di cellule sovraesprimenti CLU (PC3_{Poly CLU}) e una popolazione policlonale di controllo (PC3_{Poly mock}). L'analisi in contrasto di fase evidenzia come la maggior parte dei cloni PC3_{CLU} hanno una morfologia tondeggiante e tenda a staccarsi dal substrato di crescita, mentre i cloni di controllo PC3_{mock}, sono più somiglianti alle cellule parentali. In Fig.25, a titolo esemplificativo, è mostrata un'immagine in contrasto di fase di un clone PC3_{CLU} e di un clone di controllo PC3_{mock}.

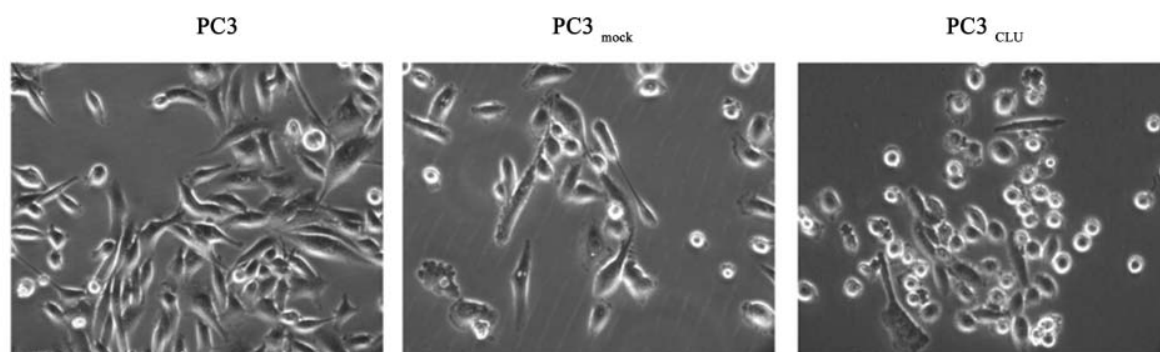


Fig.25 Morfologia cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}.

Immagini in contrasto di fase di cellule PC3, un clone PC3 di controllo (PC3_{mock}) e un clone PC3 sovraesprimenti CLU (PC3_{CLU}). Immagini acquisite con ingrandimento 20X.

I livelli di espressione di CLU nei vari cloni sono stati valutati sia come mRNA mediante qPCR (Fig.26A), sia come proteina mediante WB (Fig.26B). La quantificazione relativa dell'mRNA di CLU nei cloni PC3_{CLU} e PC3_{mock} è stata condotta confrontando i valori soglia di fluorescenza (Ct) dei campioni amplificati utilizzando una coppia di primer specifica per CLU normalizzati per il valore Ct del gene housekeeper. I primer utilizzati per valutare i livelli di CLU amplificano un frammento di sequenza comune a tutte le varianti trascrizionali

descritte in letteratura. I campioni che contengono un maggior quantitativo di mRNA di CLU raggiungeranno il Ct soglia prima dei campioni con una minor quantità di mRNA d'interesse. I risultati sono stati rappresentati graficamente mediante box plot, riportando sull'asse delle ordinate i valori di Ct normalizzati (d Ct). La qPCR, eseguita su 6 cloni PC3_{mock} e 9 cloni PC3_{CLU}, ha evidenziato una up-regolazione dell'mRNA di CLU nei cloni PC3_{CLU} rispetto ai cloni PC3_{mock}. In Fig.26B è riportata l'analisi WB condotta su 4 cloni PC3_{CLU} e 3 cloni PC3_{mock}, oltre che sulla popolazione policlonale PC3_{Poly CLU} e PC3_{Poly mock}. In tutti i cloni PC3_{CLU} sebbene a livelli diversi, si osserva una sovraespressione della proteina rispetto ai cloni PC3_{mock} sia nel lisato intracellulare (icCLU) sia nel mezzo di coltura (extraCLU). Nel lisato cellulare sono visibili le bande immunoreattive corrispondenti al precursore (psCLU) e alla forma processata pronta per la secrezione (sCLU).

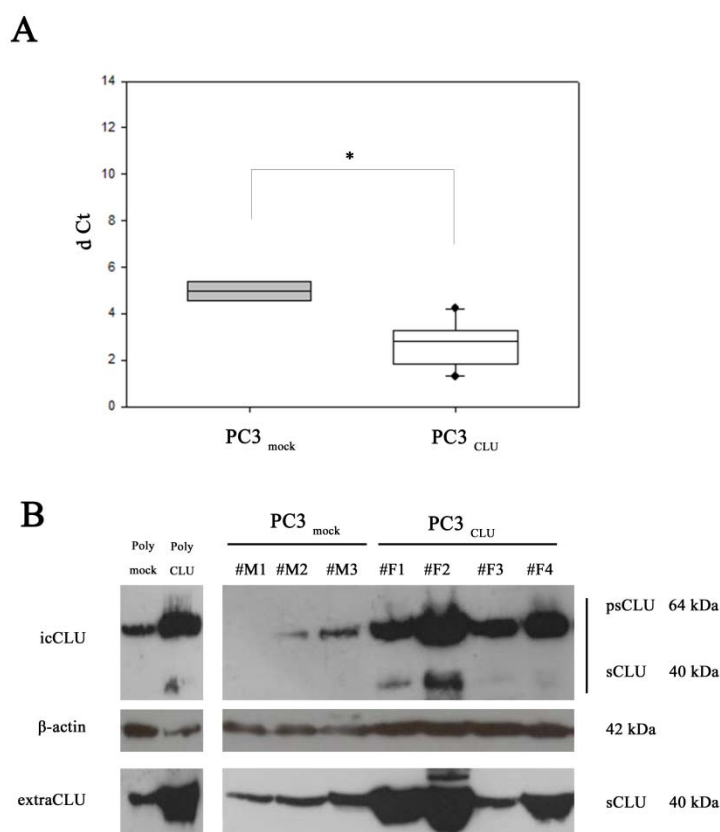


Fig.26 Livelli di espressione di CLU in cloni PC3_{CLU} e PC3_{mock}.

A) Quantificazione dell'mRNA di CLU mediante qPCR. PC3_{mock} = box plot grigio, PC3_{CLU} = box plot bianco. Sull'asse delle ordinate i valori dei Ct normalizzati rispetto al Ct della GAPDH, preso come gene di riferimento. (* P < 0.05). **B)** Determinazione dei livelli di CLU mediante WB. L'analisi è stata condotta sia sul lisato intracellulare (icCLU) e i mezzi di coltura (extraCLU) utilizzando un anticorpo anti-CLU. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. psCLU = precursore di CLU, 64 kDa; sCLU = forma processata pronta per la secrezione, 40 kDa. #M1, #M2, #M3 = singoli cloni PC3_{mock}; #F1, #F2, #F3, #F4 = singoli cloni PC3_{CLU}.

4. Risultati

L'up-regolazione della proteina nei cloni PC3_{CLU} è stata confermata anche con un esperimento d'immunocitochimica utilizzando un anticorpo rivolto contro CLU (Fig.27). Nei cloni PC3_{CLU} si può notare una maggiore intensità del segnale fluorescente verde a livello del RE, come atteso per una proteina destinata alla secrezione. I cloni PC3_{mock} evidenziano un basso livello endogeno di proteina confinata al compartimento citosolico. In nessun caso si osserva colocalizzazione del segnale blu (marcatura dei nuclei con DAPI) e del segnale fluorescente verde (CLU).

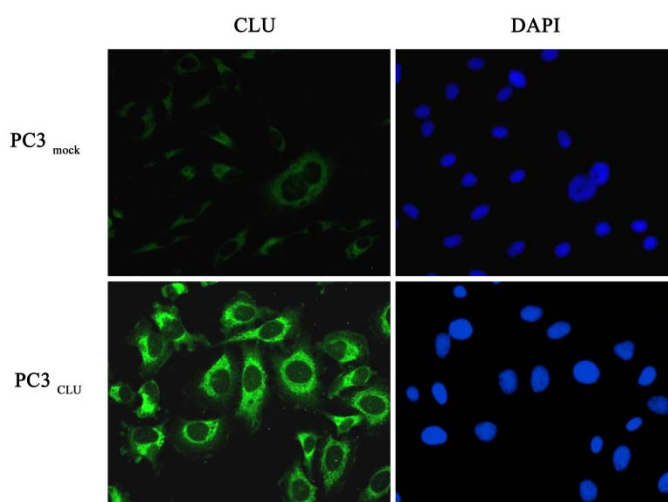


Fig.27 Localizzazione di CLU in cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}.

Analisi immunocitochimica condotta utilizzando un anticorpo anti-CLU (fluorescenza verde) in PC3_{mock} e PC3_{CLU}. I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini acquisite con ingrandimento 32X.

4.11 PROLIFERAZIONE E CICLO CELLULARE DI CLONI STABILI SOVRAESPRIENTI CLU

Per valutare le caratteristiche di velocità di crescita e di divisione cellulare dei cloni PC3_{CLU} e dei cloni PC3_{mock} è stato eseguito un saggio di proliferazione cellulare e un'analisi del ciclo cellulare per 3 cloni PC3_{CLU} e 3 PC3_{mock} (Fig.28). Dal saggio di proliferazione con cristal violetto emerge che i cloni PC3_{mock} hanno un andamento di crescita sigmoidale, paragonabile alla curva di crescita di una normale popolazione cellulare, mentre i cloni PC3_{CLU} presentano una crescita più lenta. La conta cellulare con cristal violetto a 72 ore dalla semina mostra come vi sia una differenza significativa nel numero totale di cellule tra i cloni PC3_{mock} e i cloni PC3_{CLU}, che diventa maggiore a 96 ore dalla semina (Fig.28A).

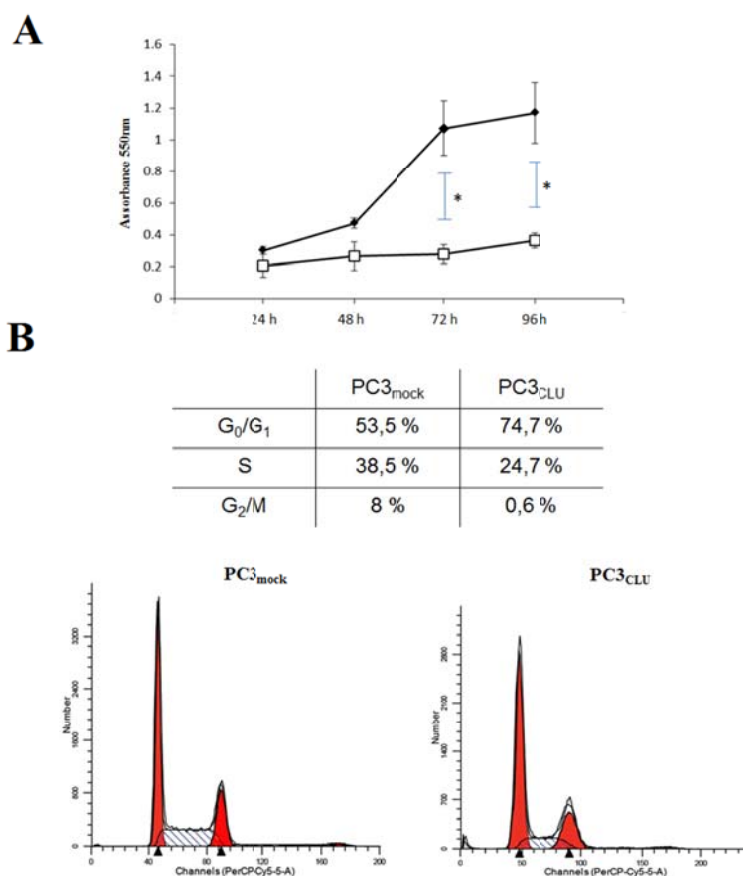


Fig.28 Effetti della sovraespressione di CLU su proliferazione e progressione del ciclo cellulare.

A) Saggio di proliferazione con cristal violetto condotto a 24, 48, 72 e 96 ore dalla semina. PC3_{mock} = quadrati neri, PC3_{CLU} = quadrati bianchi. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di assorbanza a 550 nm. Le barre d'errore rappresentano la DS di dati ottenuti da 3 cloni differenti (* P < 0.05). **B)** Analisi FACS di un clone PC3_{mock} e un PC3_{CLU} rappresentativi di tutti i campioni analizzati. In tabella è riportata la distribuzione percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

L'analisi FACS del ciclo cellulare ha messo in evidenza che mentre i PC3_{mock} sono caratterizzati da una normale distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare, i cloni PC3_{CLU} mostrano un'elevata percentuale di cellule in fase G₀/G₁ e un basso numero di cellule in fase S e G₂/M. A titolo di esempio, in Fig.28B è riportata l'analisi FACS di un clone PC3_{CLU} e di un clone PC3_{mock}. L'analisi del ciclo cellulare del clone PC3_{mock} riportato in figura, evidenzia come circa la metà delle cellule (53.5%) si trovi in fase G₀/G₁, il 38.5% in fase S e l'8% in fase G₂/M. Per il clone PC3_{CLU} riportato in figura, il 74.4% delle cellule si trova in fase G₀/G₁, il 24.7% in fase S e solo lo 0.6% in fase G₂/M. Oltre al picco corrispondente alla fase G₀/G₁ (picco più intenso) e alla fase G₂/M, è presente un picco ipodiploide a sinistra di quello rappresentativo della fase G₀/G₁, indicativo di apoptosi.

4.12 LIVELLI DI p65 IN CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU

Per valutare se la sovraespressione di CLU influenza il pathway di NF- κ B, i cloni sono stati utilizzati per lo studio dei livelli di proteina p65. Tramite WB sono state analizzate le variazioni di NF- κ B utilizzando un anticorpo capace di riconoscere la subunità di p65 (p65) e un anticorpo in grado di riconoscere specificatamente la fosforilazione sulla serina S536 (p-p65_{S536}), modificazione associata alla frazione di p65 trascrizionalmente attiva. Per confrontare le bande immunoreattive e valutare la frazione fosforilata di p65 rispetto al totale, è stata condotta un'analisi densitometrica in cui, per ogni condizione, l'intensità delle bande immunoreattive della proteina d'interesse è normalizzata per l'intensità della banda di β -actina (controllo di caricamento del campione) (Fig.29). Dall'analisi emerge che tutti i cloni esprimono p65, seppur a differenti livelli e generalmente, i cloni PC3_{CLU} hanno un livello di proteina più basso se confrontati con i cloni PC3_{mock}. Per quanto riguarda la forma fosforilata si può notare come essa sia rilevabile nei cloni PC3_{mock}, mentre non lo sia nei cloni PC3_{CLU}. Il clone PC3_{mock} #M3 rappresenta un'eccezione poiché non possiede la banda immunoreattiva corrispondente a p-p65_{S536}. È da notare che questo particolare clone esprime i più alti livelli di CLU se confrontato con gli altri cloni PC3_{mock} (Fig.26B). L'analisi eseguita sulle popolazioni cellulari eterogenee policlonali (PC3_{Poly} CLU e PC3_{Poly} mock) evidenzia risultati che, con buona approssimazione, possono ritenersi una media dei risultati ottenuti dalle singole prove su popolazioni monoclonali.

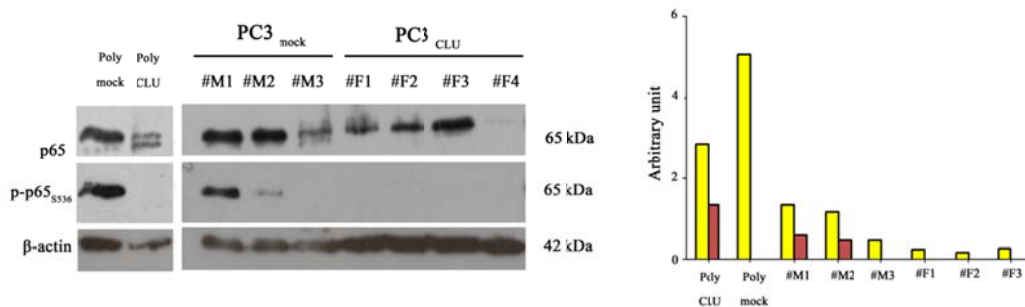


Fig.29 Livelli di espressione di p65 in cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}.

A sinistra, determinazione mediante WB dei livelli di p65 e di p-p65_{S536} in cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}, oltre che nella popolazione policlonale PC3_{Poly} mock e in PC3_{Poly} CLU. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. A destra, analisi densitometrica delle bande immunoreattive. p65 = barre gialle, p-p65_{S536} = barre rosse.

4.13 ATTIVITÀ DI p65 IN CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI CLU

Poiché la fosforilazione di p65 sulla serina S536 è una modificazione che ne precede la traslocazione nel nucleo e l'attivazione della trascrizione di geni target, dopo aver osservato livelli differenti di fosforilazione di p65 tra i cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}, se ne è valutata la localizzazione. A tal fine è stato condotto un esperimento d'immunocitochimica marcando i cloni con un anticorpo rivolto contro p-p65_{S536} (Fig.30A). La maggiore intensità di fluorescenza rossa (p-p65_{S536}) che si osserva nei cloni PC3_{mock} rispetto ai cloni PC3_{CLU} conferma quanto già verificato con l'analisi WB. Nei cloni PC3_{mock} la forma fosforilata di p65 ha localizzazione prevalentemente nucleare e questo riflette l'attivazione costitutiva della via tipica delle cellule parentali PC3. Al contrario, nei cloni PC3_{CLU} oltre al fatto che l'intensità della fluorescenza rossa è inferiore, si osserva la presenza di un segnale diffuso anche nel citoplasma.

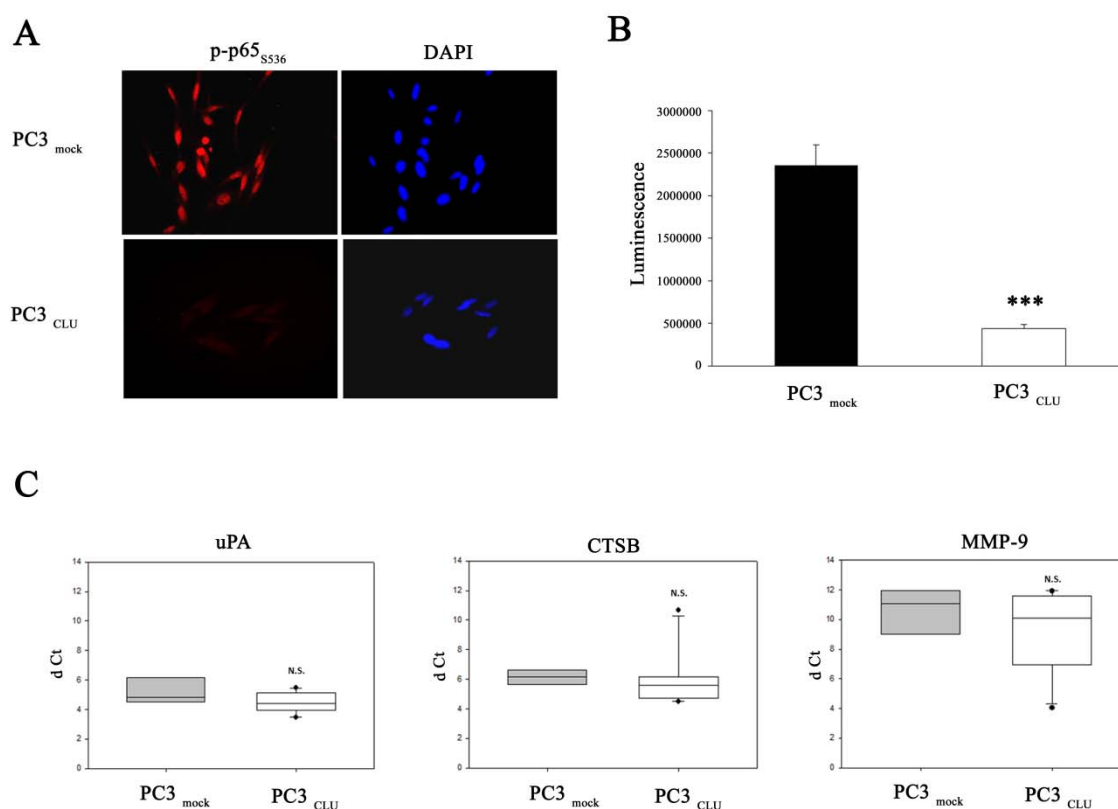


Fig.30 Attività di p65 in cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}.

A) Analisi immunocitochimica condotta utilizzando un anticorpo anti- p-p65_{S536} (fluorescenza rossa) in PC3_{mock} e PC3_{CLU}. I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini acquisite con ingrandimento 32X. **B)** Attività di NF- κ B in cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU} valutata mediante saggio di luciferasi. I valori di luminescenza sono stati valutati 24 ore dopo la trasfezione del plasmide reporter e sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine. Le barre d'errore rappresentano la DS di 6 determinazioni indipendenti. PC3_{mock} = barre nere, PC3_{CLU} = barre bianche (** P < 0.01). L'esperimento è stato ripetuto in triplicato. **C)** Quantificazione dell'mRNA di uPA, CTSB, MMP-9 mediante qPCR. PC3_{mock} = box plot grigio, PC3_{CLU} = box plot bianco. Sull'asse delle ordinate i valori dei Ct normalizzati rispetto al Ct della GAPDH, preso come gene di riferimento. N.S. = non significativo.

4. Risultati

L'attività di NF- κ B è stata valutata utilizzando un plasmide reporter contenente elementi responsivi a NF- κ B a monte del gene della luciferasi. Un clone PC3_{mock} e in un clone PC3_{CLU} sono stati trasfettati con il plasmide reporter e l'attività di NF- κ B è stata valutata monitorando la luminescenza 24 ore dopo la manovra di trasfezione (Fig.30B). Nei cloni PC3_{mock} l'attività è più elevata di quella misurata nei cloni PC3_{CLU}. Pertanto la sovraespressione stabile di CLU si associa ad una riduzione dell'attività di NF- κ B.

L'effetto della sovraespressione stabile di CLU sull'attività trascrizionale di NF- κ B è stata inoltre valutata analizzando i livelli dell'mRNA di alcuni geni, coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare, che hanno nel loro promotore l'elemento di legame per NF- κ B (Fig.30C). L'espressione relativa di uPA, CTSB e MMP-9 è stata studiata in 6 cloni PC3_{mock} e 9 cloni PC3_{CLU} oltre che nelle popolazioni policlonali PC3_{Poly CLU} e PC3_{Poly mock}, confrontando i valori soglia di fluorescenza (Ct) dei campioni amplificati ognuno dei quali normalizzato per il valore Ct del gene housekeeper. In figura 30C sono riportati i Δ Ct (Ct normalizzati) indicativi dell'espressione di uPA, CTSB e MMP-9 in cellule sovraesprimenti CLU e nei rispettivi controlli mock. Sono riportati anche i valori misurati nelle popolazioni policlonali (PC3_{Poly CLU} e PC3_{Poly mock}). I risultati dell'analisi qPCR mostrano che i geni uPA, CTSB e MMP-9 sono espressi agli stessi livelli se si confrontano le cellule sovraesprimenti stabilmente CLU con i cloni PC3_{mock}.

4.14 SOVRAESPRESSIONE TRANSIENTE DI CLU IN CELLULE PC3

La sovraespressione transiente di CLU è stata ottenuta trasfettando le cellule PC3 con lo stesso plasmide d'espressione utilizzato per generare i cloni stabili (pIRES-CLUfull). Le cellule non sono sottoposte a selezione clonale, ma vengono analizzate dopo 24 e 48 ore dalla trasfezione. Il controllo dell'esperimento è costituito da cellule PC3 trasfettate con il plasmide pIRES-mock. L'efficienza di trasfezione, valutata trasfettando le cellule PC3 con il plasmide pEGFP-N1, è pari al 35%, dopo 24 ore, mentre sale al 54% a 48 ore dalla trasfezione (Fig.31A).

L'analisi in contrasto di fase mostra differenze morfologiche tra le cellule trasfettate con il pIRES-CLU (F24 e F48) e quelle trasfettate con il plasmide pIRES-mock (M24 e M48) (Fig.31B). Le cellule PC3 F24 assumono una morfologia tondeggianti con scarsi prolungamenti citoplasmatici, inoltre si osserva un'elevata percentuale di morte cellulare.

Entrambe queste alterazioni sono accentuate nelle cellule PC3 F48. Al contrario, le cellule PC3 M24 e M48 hanno una morfologia molto somigliante a quella delle cellule parentali.

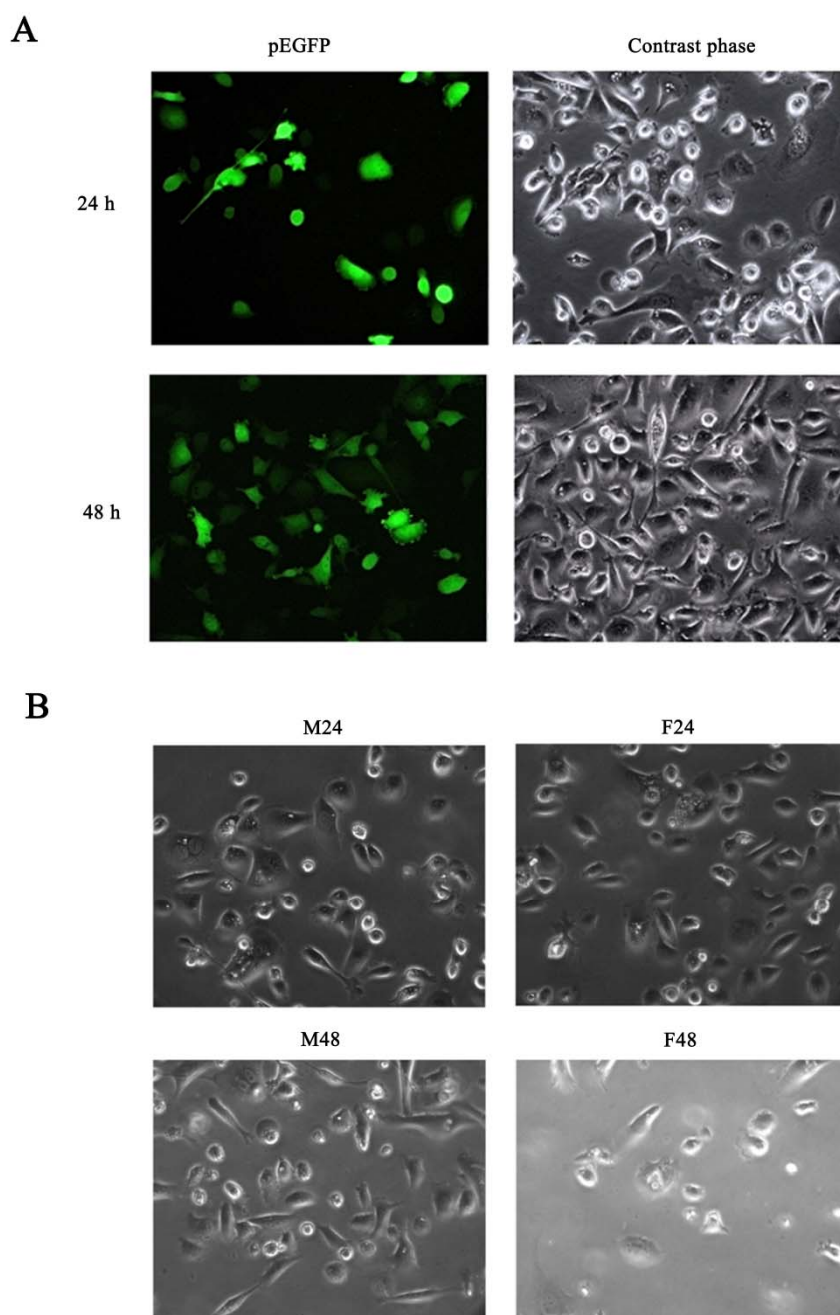


Fig.31 Morfologia delle cellule PC3 sovraesprimenti CLU.

A) Efficienza di trasfezione valutata a 24 e 48 ore in cellule PC3 trasfettate con pEGFP-N1. Immagini acquisite in fluorescenza e in contrasto di fase con ingrandimento 20X. L'efficienza di trasfezione è stimata calcolando il rapporto tra il numero di cellule verdi e il numero totale di cellule presenti nel campo. **B)** Immagini in contrasto di fase di cellule PC3 trasfettate con il plasmide pIRES-mock (M24 e M48) e con il plasmide pIRES-CLUfull (F24 e F48). Immagini acquisite con ingrandimento 20X.

4. Risultati

La verifica della sovraespressione di CLU è stata eseguita valutando sia i livelli di mRNA sia di proteina, nelle cellule PC3 pIRES-CLUfull e pIRES-mock a 24 e 48 ore dalla trasfezione.

L'analisi qPCR ha evidenziato una up-regolazione dell'mRNA di CLU nelle cellule trasfettate con pIRES-CLUfull rispetto alle cellule di controllo già a 24 ore dalla trasfezione (Fig.32A). L'incremento dei livelli di mRNA di CLU diventa ancora più elevato a 48 ore dalla trasfezione.

Coerentemente all'aumento dei trascritti si osserva un incremento dei livelli di proteina sia intracellulare (icCLU) sia rilasciata nell'ambiente extracellulare (extraCLU) in cellule PC3 trasfettate con il plasmide pIRES-CLUfull (F24 e F48) se confrontate con quelle trasfettate con il plasmide pIRES-mock (M24 e M48) (Fig.32B). Nella frazione intracellulare si trova l'up-regolazione sia del precursore (psCLU) sia della forma matura pronta per la secrezione (sCLU). Sono, inoltre, presenti altre bande immunoreattive con peso variabile tra i 64 e i 40 kDa e poiché i campioni, prima dell'analisi SDS-PAGE, non sono stati sottoposti a trattamento con enzimi deglicosilanti non è possibile escludere che tali bande immunoreattive siano forme intermedie, a diverso grado di glicosilazione, non ancora completamente processate.

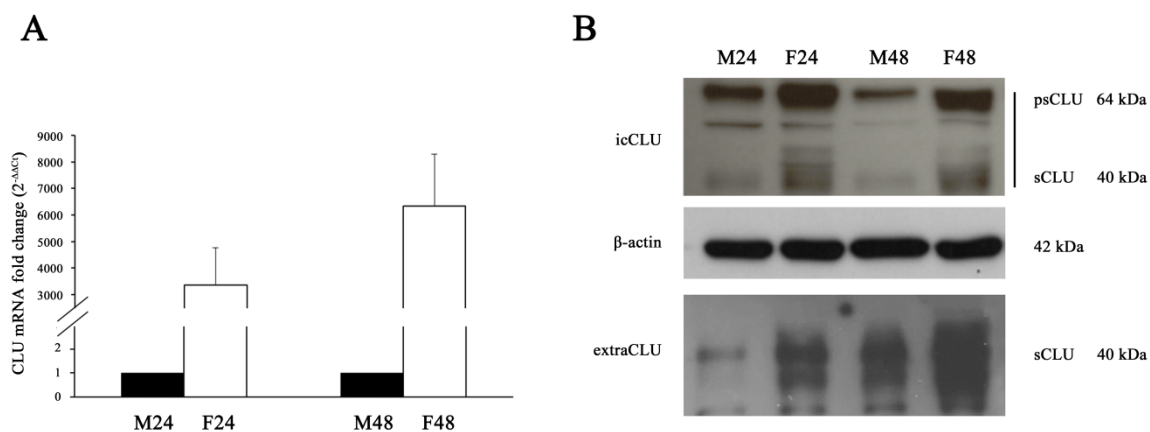


Fig.32 Livelli di espressione di CLU in cellule PC3 sovraesprimenti CLU.

A) Quantificazione dell'mRNA di CLU mediante qPCR in PC3 trasfettate con il plasmide pIRES-mock (M) e pIRES-CLUfull (F) analizzate a 24 e 48 ore dalla trasfezione. pIRES-mock = barre nere, pIRES-CLUfull = barre bianche. L'espressione relativa di CLU nelle cellule F24 e F48 è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione d'espressione rispetto all'mRNA di CLU rilevato nelle cellule M24 e M48 (riferimento fissato pari a 1). Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti. Tutti i risultati sono statisticamente significativi ($P < 0.01$). **B)** Determinazione dei livelli di CLU in cellule PC3 M24, F24, M48 e F48. L'analisi è stata condotta sia nel lisato intracellulare (icCLU) sia nei mezzi di coltura (extraCLU) utilizzando un anticorpo anti-CLU. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. psCLU = precursore di CLU, 64 kDa; sCLU = forma matura secreta o pronta per la secrezione, 40 kDa.

4.15 LIVELLI DI p65 IN CELLULE PC3 SOVRAESPRIMENTI CLU

Nelle cellule PC3 pIRES-mock e pIRES-CLUfull sono stati analizzati i livelli di proteina p65 per verificare se la manovra di sovraespressione transiente ha gli stessi effetti della sovraespressione stabile di CLU. Tramite analisi WB è stato possibile determinare che, a differenza di quanto osservato per i cloni stabili, la sovraespressione transiente di CLU non riduce significativamente i livelli totali di proteina di p65, che risulta solo lievemente aumentata a 48 ore (Fig.33). Per quanto riguarda la forma fosforilata di p65, si può notare un comportamento simile a quanto osservato nei cloni: essa è presente nelle cellule PC3 trasfettate con il plasmide di controllo, mentre è assente nelle cellule PC3 pIRES-CLUfull sia a 24 sia a 48 ore. L'analisi densitometrica delle bande immunoreattive, normalizzate per il contenuto di β -actina, evidenzia la consistenza numerica del dato.

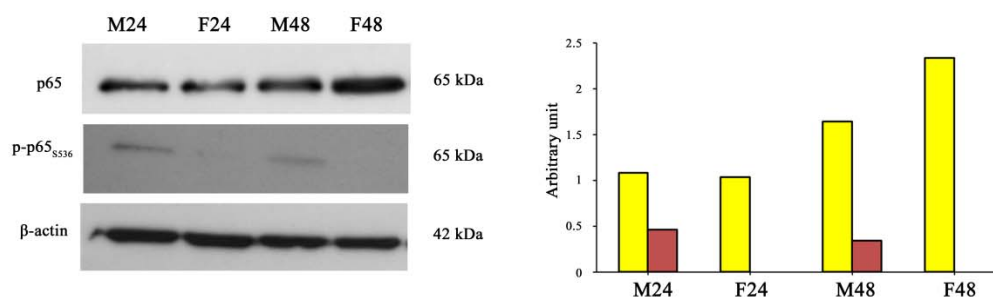


Fig.33 Livelli di proteina p65 in PC3 sovraesprimenti CLU.

A sinistra, determinazione dei livelli di p65 e della forma fosforilata (p-p65_{S536}) in cellule PC3 trasfettate con il plasmide pIRES-mock (M24 e M48) o con il plasmide pIRES-CLUfull (F24 e F48) mediante WB. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. A destra, analisi densitometrica delle bande immunoreattive. p65 = barre gialle, p-p65_{S536} = barre rosse. L'esperimento è stato condotto in triplicato.

4.16 ATTIVITÀ DI p65 IN CELLULE PC3 SOVRAESPRIMENTI CLU

L'attività di NF- κ B nelle cellule sovraesprimenti CLU è stata valutata sia mediante un saggio di luciferasi con plasmide reporter, sia valutando i livelli di mRNA di uPA, CTSB e MMP-9. Il saggio d'attività è stato condotto utilizzando lo stesso plasmide reporter usato per lo studio dell'attività di NF- κ B nei cloni sovraesprimenti CLU. I livelli di luciferasi sono stati monitorati dopo 24 ore dalla manovra di co-trasfezione del plasmide reporter con il plasmide pIRES-mock o pIRES-CLUfull (Fig.34A). In accordo con i livelli di fosforilazione di p65, l'attività di NF- κ B risulta significativamente ridotta nelle cellule PC3 in cui CLU è up-regolata rispetto alle cellule di controllo trasfettate con pIRES-mock. Questo risultato è concorde con quanto osservato in precedenza nei cloni PC3_{CLU}.

4. Risultati

L'analisi qPCR dei livelli di espressione dei geni coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare evidenzia come la sovraespressione di CLU a 48 ore determini un decremento significativo degli mRNA di uPA e CTSB in cellule PC3 trasfettate con il plasmide pIRES-CLUfull rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il plasmide pIRES-mock. Per quanto riguarda MMP-9, nonostante non venga raggiunta la soglia di significatività a causa della elevata deviazione standard dei dati, la sovraespressione di CLU si associa ad una tendenza alla diminuzione dell'mRNA di questo gene (Fig.34B).

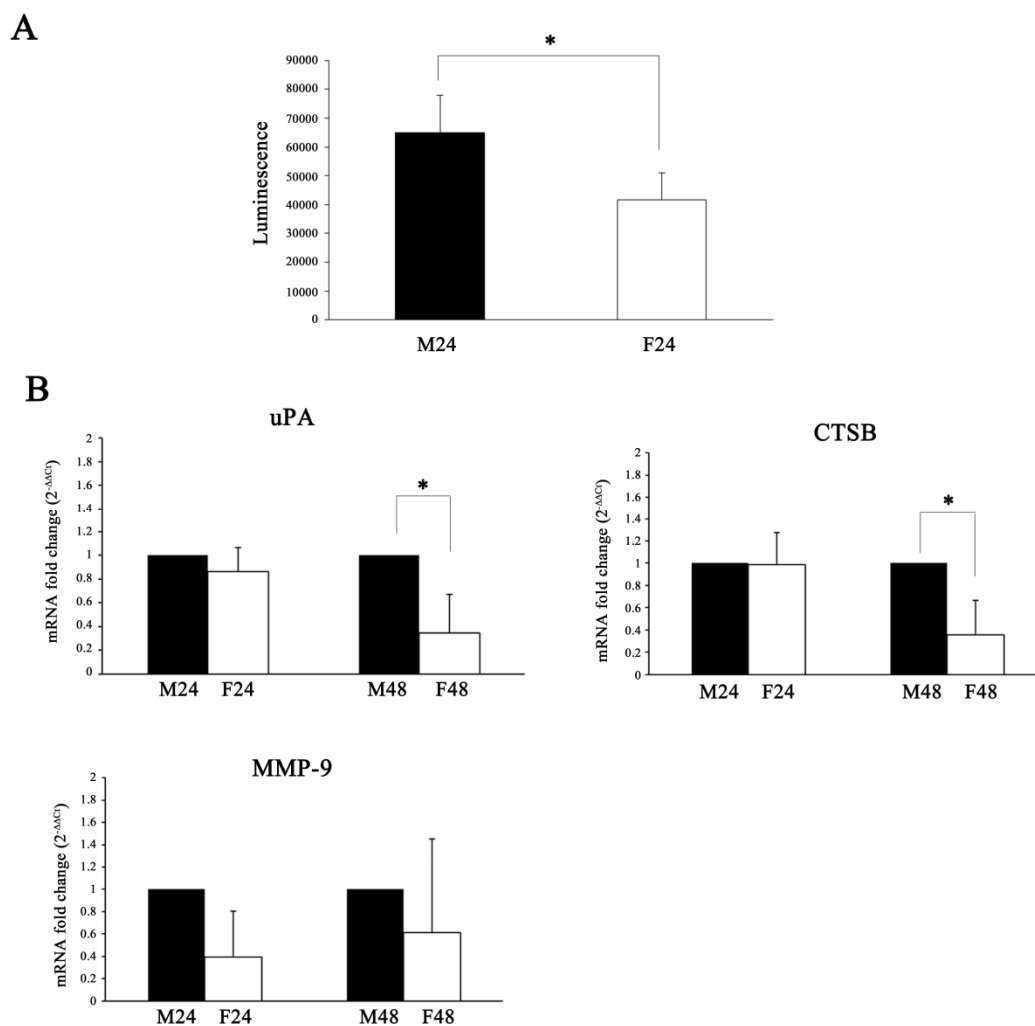


Fig.34 Attività di NF-kB in cellule PC3 sovraesprimenti CLU.

A) Attività di NF-kB in cellule PC3 co-trasfettate con un plasmide reporter responsivo a NF-kB e il plasmide pIRES-mock o pIRES-CLUfull valutata mediante saggio di luciferasi. I valori di luminescenza sono stati valutati 24 ore dopo la trasfezione e sono stati normalizzati per il contenuto di proteine. Le barre d'errore rappresentano la DS di 6 determinazioni indipendenti, ogni esperimento è stato ripetuto in triplicato (* $P < 0.05$). **B)** Quantificazione dell'mRNA di uPA, CTSB, MMP-9 mediante qPCR. L'espressione relativa di ogni gene nelle cellule F24 e F48 è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione d'espressione rispetto all'mRNA dello stesso gene rilevato nelle cellule M24 e M48 (riferimento fissato pari a 1). Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti (* $P < 0.05$).

4.17 LIVELLI DI p65 IN CELLULE PC3 IN CUI CLU È SILENZIATO

Per confermare ulteriormente che l'inibizione dell'attività di NF- κ B sia direttamente correlabile alla presenza di CLU, i livelli di p65 sono stati misurati in cellule PC3 in cui il gene di CLU è stato silenziato, siRNA CLU. Il controllo dell'esperimento consiste in cellule PC3 trasfettate con siRNA NC. Dopo aver verificato l'effettiva inibizione di CLU sia tramite analisi qPCR (Fig.35A), sia mediante WB (Fig.35B), sono stati valutati i livelli di proteina p65 totale e della forma fosforilata p-p65_{S536} (Fig.35C). In seguito al silenziamento di CLU non si osserva una variazione dei livelli di p65 totale né a 48 né a 72 ore, mentre è possibile osservare un incremento della forma fosforilata di p65 in cellule in cui CLU è silenziato rispetto al controllo NC. L'effetto è più evidente alle 72 ore.

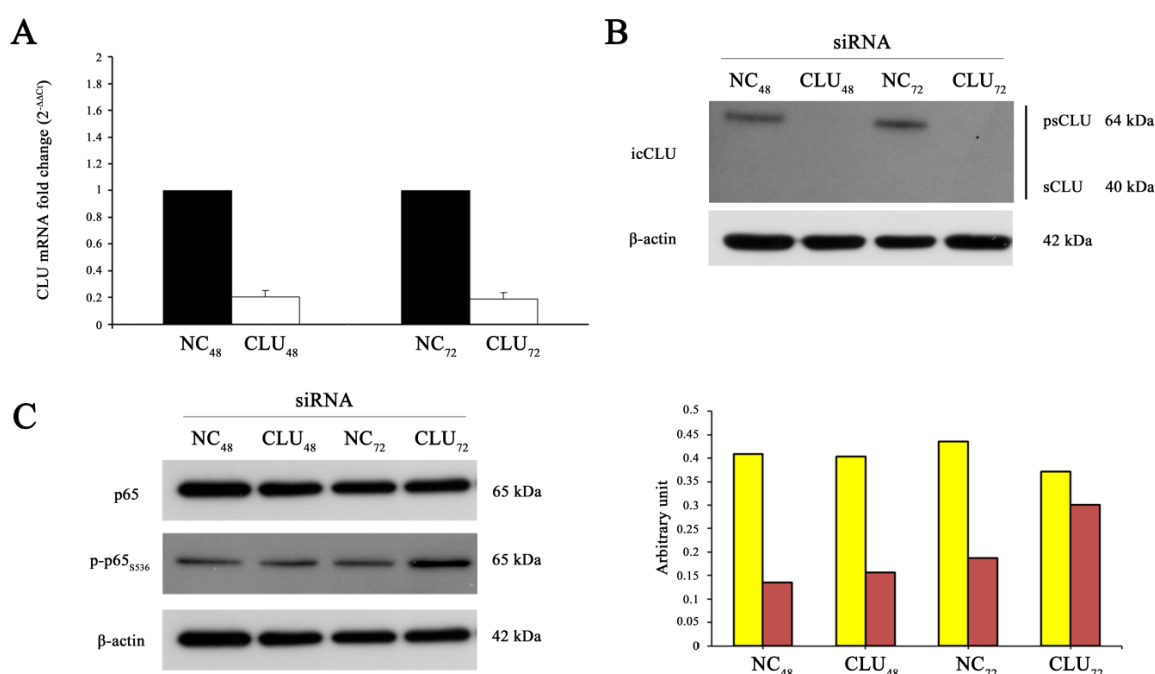


Fig.35 Livelli di proteina di p65 in PC3 in cui CLU è silenziata.

A) Quantificazione dell'mRNA di CLU mediante qPCR in PC3 trasfettate con siRNA CLU o NC analizzate a 48 (siRNA 48) e 72 ore (siRNA 72) dalla trasfezione. siRNA NC = barre nere, siRNA CLU = barre bianche. L'espressione relativa di CLU è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione d'espressione rispetto all'mRNA di CLU rilevato nelle cellule NC₄₈ e NC₇₂ (riferimento fissato pari a 1). Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti. Tutti i risultati sono statisticamente significativi ($P < 0.01$). **B)** Determinazione dei livelli di CLU in cellule PC3 NC₄₈, CLU₄₈, NC₇₂ e CLU₇₂ mediante WB. L'analisi è stata condotta sul lisato intracellulare (icCLU) utilizzando un anticorpo anti-CLU. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. psCLU = precursore di CLU, 64 kDa; sCLU = forma processata pronta per la secrezione, 40 kDa. **C)** A sinistra, determinazione dei livelli di p65 e della forma fosforilata (p-p65_{S536}) in cellule PC3 trasfettate con siRNA NC (NC₄₈ e NC₇₂) o siRNA CLU (CLU₄₈ e CLU₇₂) mediante WB. La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. A destra, analisi densitometrica delle bande immunoreattive. p65 = barre gialle, p-p65_{S536} = barre rosse. L'esperimento è stato condotto in triplicato.

4.18 ATTIVITÀ DI p65 IN CELLULE PC3 IN CUI CLU È SILENZIATO

L'attività di NF- κ B nelle cellule in cui CLU è silenziata, è stata valutata sia con un saggio di luciferasi con un plasmide reporter, sia valutando i livelli di mRNA di uPA, CTSB e MMP-9. Il saggio d'attività è stato condotto utilizzando lo stesso plasmide reporter usato per lo studio dell'attività di NF- κ B nei cloni sovraespressanti CLU, monitorando i livelli di luciferasi a 24 ore dalla manovra di co-trasfezione del plasmide reporter con siRNA CLU o siRNA NC (Fig.36A). In accordo con l'aumento dei livelli di fosforilazione di p65, l'attività di NF- κ B è aumentata in modo significativo in cellule PC3 in cui CLU è silenziata rispetto alle cellule di controllo trasfettate con il siRNA NC.

L'analisi qPCR dei livelli di espressione dei geni coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare evidenzia come la delezione di CLU sia a 48 che a 72 ore, determina un aumento significativo dei livelli di mRNA di MMP-9 in confronto a cellule PC3 trasfettate con il siRNA NC (Fig.36B). Per quanto riguarda CTSB, nonostante non venga raggiunta la soglia di significatività, si osserva una tendenza all'aumento dell'espressione in cellule trasfettate con il siRNA CLU rispetto a quelle trasfettate con il siRNA NC. I livelli di uPA restano invariati in qualsiasi condizione testata.

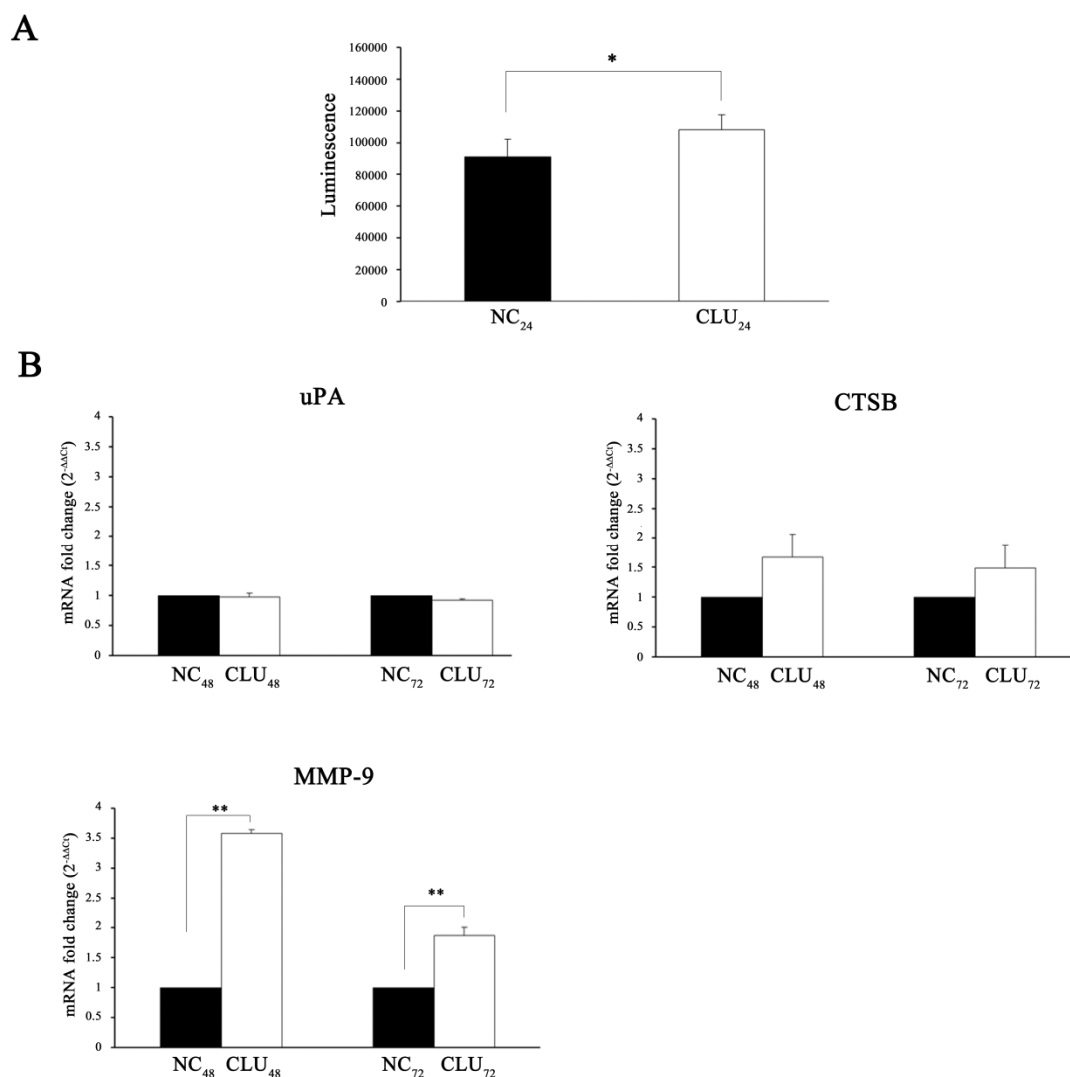


Fig.36 Attività di NF-κB in cellule PC3 in cui l'espressione di CLU è silenziata.

A) Attività di NF-κB in cellule PC3 trasfettate con un plasmide reporter responsivo a NF-κB e il siRNA NC o il siRNA CLU valutata mediante saggio di luciferasi. I valori di luminescenza sono stati valutati 24 ore dopo la trasfezione e sono stati normalizzati per il contenuto di proteine. Le barre d'errore rappresentano la DS di 6 determinazioni indipendenti, ogni esperimento è stato ripetuto in triplicato (* $P < 0.05$). **B)** Quantificazione dell'mRNA di uPA, CTSB, MMP-9 mediante qPCR. L'espressione relativa di ogni gene nelle cellule CLU₄₈ e CLU₇₂ è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ come variazione d'espressione rispetto all'mRNA dello stesso gene rilevato nelle cellule NC₄₈ e NC₇₂ (riferimento fissato pari a 1). Le barre d'errore rappresentano la DS di 3 determinazioni indipendenti (* $P < 0.05$).

4.19 INTERAZIONE TRA CLU E p65

Si è voluto testare se l'effetto inibitorio di CLU sull'attività di NF- κ B sia imputabile ad un'interazione diretta tra le due proteine. Per verificare tale ipotesi, sono stati utilizzati i lisati intracellulari di un clone PC3_{mock} e di un clone PC3_{CLU} in un esperimento di co-immunoprecipitazione con gli anticorpi anti-CLU e anti-p65 (Fig.37). Come controllo negativo degli esperimenti l'immunoprecipitazione è stata condotta con un anticorpo anti-IgG di topo. L'analisi WB dell'immunoprecipitazione rivela come nei lisati cellulari immunoprecipitati con l'anticorpo anti-CLU non compare alcuna banda corrispondente a p65 né in cloni PC3_{mock} né quando CLU è sovraespressa (cloni PC3_{CLU}). L'assenza d'interazione fisica diretta tra CLU e p65 è stata confermata immunoprecipitando gli stessi lisati cellulari con l'anticorpo anti-p65 ed eseguendo l'analisi WB con l'anticorpo anti-CLU: non si osserva alcuna banda immunoreattiva per CLU né nel lisato del clone PC3_{mock} né nel lisato del clone PC3_{CLU}.

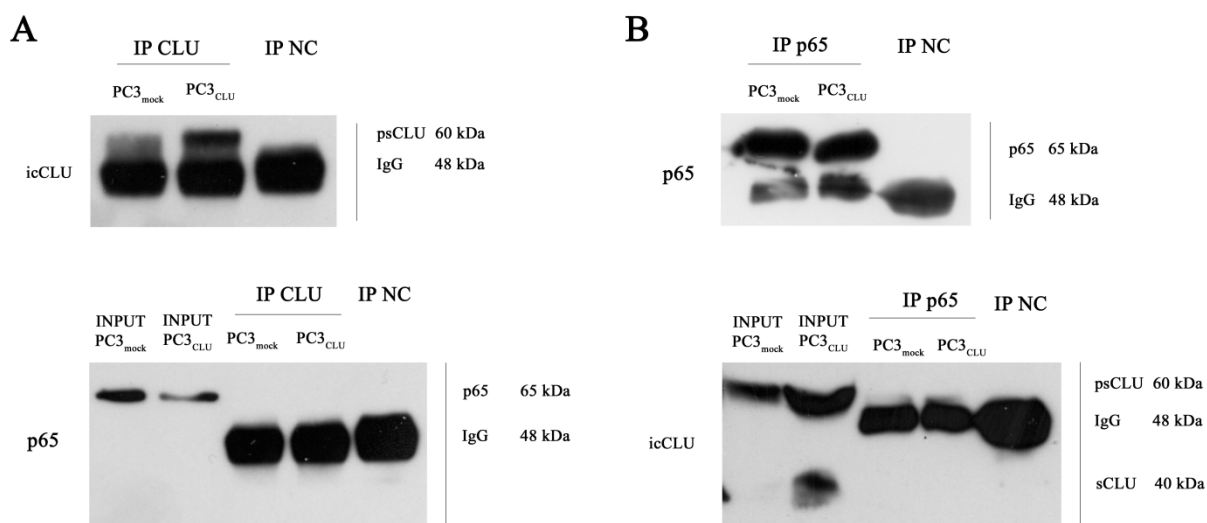


Fig. 37 Interazione tra CLU e p65 in cloni PC3_{mock} e PC3_{CLU}.

A) Immunoprecipitazione di CLU nei lisati intracellulari di un clone PC3_{mock} e un clone PC3_{CLU}. L'avvenuta immunoprecipitazione quantitativa di CLU è stata valutata mediante WB utilizzando un anticorpo anti-CLU (pannello superiore). L'interazione fisica con p65 è stata valutata sugli stessi lisati cellulari (pannello inferiore) utilizzando un anticorpo anti-p65 e confrontando la frazione di p65 immunoprecipitata insieme a CLU (lane IP CLU) rispetto alla quantità totale presente nei lisati cellulari (INPUT PC3_{mock} e INPUT PC3_{CLU}). IP NC = immunoprecipitazione con anticorpo anti-IgG. **B)** Immunoprecipitazione di p65 nei lisati intracellulari di un clone PC3_{mock} e un clone PC3_{CLU}. L'avvenuta immunoprecipitazione quantitativa di p65 è stata valutata mediante WB utilizzando un anticorpo anti-p65 (pannello superiore). L'interazione fisica con p65 è stata valutata sugli stessi lisati cellulari (pannello inferiore) utilizzando un anticorpo anti-CLU e confrontando la frazione di CLU immunoprecipitata insieme a p65 (lane IP p65) rispetto alla quantità totale presente nei lisati cellulari (INPUT PC3_{mock} e INPUT PC3_{CLU}). IP NC = immunoprecipitazione con anticorpo anti-IgG.

5. Discussione e conclusioni

CLU è una glicoproteina ubiquitaria espressa dalla maggior parte dei tessuti e presente in molti fluidi biologici. È secreta nell'ambiente extracellulare come eterodimero costituito da una catena β e da una catena α , la cui funzione è quella di chaperone ATP-indipendente. È implicata in quasi tutti i processi fisiologici fondamentali dell'organismo umano e nello sviluppo di diverse malattie come l'Alzheimer e il tumore. Oltre a una localizzazione extracellulare, CLU è stata ritrovata nel citosol, ma ad oggi poche sono le informazioni inerenti al ruolo che essa svolge all'interno della cellula. Un recente aggiornamento di NCBI ha attribuito al gene di CLU tre trascritti di riferimento (CLU 1, CLU 2 e CLU 3), ma ancora rimane da chiarire la loro regolazione. Questo lavoro di tesi ha implementato le conoscenze in merito ai trascritti CLU 1 e CLU 2 e alla loro regolazione, oltre ad approfondire il ruolo della forma citosolica della proteina in relazione al signaling di NF- κ B.

Nella prima parte del lavoro sperimentale sono stati valutati i livelli di espressione delle singole varianti trascrizionali CLU 1 e CLU 2 in differenti linee cellulari sia normali sia tumorali. Le analisi RT-PCR e qPCR rivelano che, sia nelle cellule epiteliali prostatiche sia nei fibroblasti, la variante espressa a livelli più alti è CLU 1 indipendentemente dal grado di malignità della linea cellulare presa in esame. CLU 2 è rilevabile mediante RT-PCR solo nelle WI38, mentre è rilevabile in PNT1a, PC3 e DU145, seppur a livelli molto bassi, solo attraverso una tecnica più sensibile quale la qPCR. L'analisi RT-PCR dei trascritti in cellule epiteliali benigne e tumorigeniche derivanti da tessuto mammario e dal polmone, ha permesso di confermare quanto già osservato nelle cellule epiteliali prostatiche.

È da sottolineare come l'amplificazione in RT-PCR della sequenza completa NM_001831 sia sistematicamente fallita, confermando i risultati già pubblicati da altri gruppi di ricerca che hanno cercato di amplificare la porzione al 5' della sequenza utilizzando la tecnica 5' RACE^{8,11}. I risultati evidenziano che CLU 1 è più corta al 5' rispetto alla sequenza depositata in NCBI (NM_001831) e nello specifico si ritiene che tale sequenza abbia inizio a valle della TATA box. Ne consegue che la proteina che ha origine dal trascritto CLU 1 è tradotta a partire dall'AUG presente nell'esone 2, comune a tutte le varianti trascrizionali.

L'analisi del trascritto totale e delle proteine evidenzia che i fibroblasti normali sono le cellule che producono la maggior quantità di CLU, mentre le PC3, le cellule con il grado di malignità più elevato, producono i più bassi livelli di CLU. Questi dati confermano quanto già riportato in letteratura da differenti gruppi di ricerca^{91-93,140}. Per contro, altri lavori sperimentali indicano che CLU è sovraespressa nel PCa e correla positivamente con un basso grado di

5. *Discussione e conclusioni*

differenziamento del tumore e con l'indipendenza dagli androgeni^{88,89}. Questa discrepanza di dati è stata riportata anche in studi inerenti il tumore del colon e del polmone⁷⁰⁻⁷². L'esistenza di differenti mRNA espressi a vari livelli, in diverse popolazioni di cellule, potrebbe spiegare almeno in parte la discrepanza tra i dati riportati in letteratura.

Sebbene i dati evidenzino come CLU 2 sia espressa a livelli estremamente bassi in linee cellulari tumorali, mentre risulta espressa a livelli apprezzabili solo nei fibroblasti normali, non si esclude la possibilità che l'espressione di CLU 2 sia associabile alle tipologie cellulari, piuttosto che ad un fenotipo patologico neoplastico. Nelle cellule Toledo e OCI-LY10, modelli di linfoma, l'unica variante trascrizionale espressa è CLU 2. In queste cellule i livelli di espressione di CLU 2 approssimano bene i livelli di CLU TOT confermando che questa è la variante trascrizionale più rappresentativa. I dati supportano l'idea che CLU 1 e CLU 2 sono espressi a diversi livelli dipendentemente dal contesto e dalla tipologia cellulare considerata. La somministrazione di farmaci comunemente utilizzati nella chemioterapia dei linfomi non-Hodgkin, come la Doxorubicina e il Rituximab, determinano un incremento di CLU TOT, in concomitanza ad un aumento di CLU 2.

Data la peculiarità delle cellule Toledo di esprimere solo la variante CLU 2 in tutte le condizioni sperimentali testate, queste cellule sono state utilizzate per la caratterizzazione della proteina prodotta a partire da tale trascritto. Contrariamente a quanto riportato in NCBI, dove la variante trascrizionale corrispondente a CLU 2 è stata classificata come RNA non codificante, è stato verificato che tale mRNA viene tradotto nella forma proteica più comune e studiata di CLU, ovvero la forma secreta di 449 aa. La proteina che si genera da questo trascritto è identica a quella che viene prodotta a partire da CLU 1. Essa è presente nella frazione citosolica dei lisati intracellulari ed è rilevabile mediante WB come due bande corrispondenti al precursore non glicolisato (psCLU) e alla forma processata pronta per la secrezione (sCLU). La somministrazione di chemioterapici incrementa i livelli di CLU 2 e la quantità totale di proteina prodotta, senza però modificarne la localizzazione.

In letteratura, sono riportati diversi lavori che propongono una regolazione di CLU per via epigenetica nel PCa^{23,29}, nelle cellule endoteliali tumorali²⁸, in cellule neuronali umane²⁶ e in cellule della retina²⁷. Nessuno degli studi citati ha però valutato l'effetto della somministrazione di farmaci epigenetici sulla regolazione della trascrizione delle varianti CLU 1 e CLU 2. In questo lavoro di tesi, è stato dimostrato per la prima volta che la somministrazione di TSA, da solo o in combinazione con AZDC, induce in cellule PC3 e

DU145 un incremento significativo dell'espressione di CLU 1 e, in modo più marcato, di CLU 2. I trattamenti con farmaci epigenetici inducono nelle cellule prostatiche un aumento di traduzione e secrezione di sCLU. L'aumento dell'espressione di CLU è concomitante con l'induzione del processo di morte cellulare in entrambe le linee cellulari testate mentre correla con l'attivazione delle caspasi solo nelle DU145. Il silenziamento di CLU in PC3 e DU145 non determina una differenza significativa nella vitalità di entrambe le linee cellulari sottoposte a trattamento con TSA o AZDC-TSA. Si deve quindi concludere che CLU non è direttamente coinvolta nel meccanismo di morte cellulare indotta dai farmaci epigenetici in cellule tumorali prostatiche.

La trascrizione di mRNA differenti nella regione 5'-UTR, che codificano per la stessa proteina, con una probabile espressione tessuto-specifica e differente efficienza di traduzione, è spesso associata alla presenza di promotori differenti che rispondono a specifici stimoli¹⁴¹. CLU 1 possiede un esone 1 non tradotto di dimensioni ridotte, mentre CLU 2 presenta una regione 5'-UTR di 276 pb, potenzialmente in grado di generare strutture secondarie che ne inibiscono la traduzione. L'analisi *in silico* del gene di CLU ha rilevato la presenza di due putative regioni promotrici nell'intorno dei TSS di CLU 1 e CLU 2. La regione P1 corrisponde al promotore di CLU già identificato da Wong e collaboratori¹³ che regola l'espressione di CLU 1. Tale regione è stata studiata da molti gruppi di ricerca che hanno verificato il legame di diversi fattori di trascrizione (Tabella 2)^{16-18,21}. In questo lavoro di tesi è stata identificata, per la prima volta nell'uomo, una nuova regione regolatrice chiamata P2, posizionata a valle di P1, nell'intorno del TSS2 e responsabile della regolazione dell'espressione di CLU 2. P2 è un promotore privo di TATA box con una sequenza ricca in GC e caratterizzato da due siti di legame per SP1, un enancher frequentemente ritrovato nei promotori privi di TATA box¹⁴². L'analisi *in silico* ha inoltre evidenziato la presenza di un putativo sito di legame per YY1, un fattore trascrizionale che contribuisce in modo significativo alla trans-attivazione/repressione delle HSPs; due siti di legame per STAT e MYCN e un sito di legame per NF-κB. Questi sono tutti fattori noti per essere coinvolti nella regolazione dell'espressione di CLU⁹⁷. La sequenza di P2 si caratterizza inoltre per la presenza di un sito di legame per NFI, un fattore implicato in molti processi connessi alla crescita cellulare, tra cui la repressione trascrizionale di p21 in linee di fibroblasti; un sito di legame per il fattore nucleare 4 degli epatociti (HNF-4) sul filamento negativo e un sito di legame per ARP-1 sul filamento positivo. HNF-4 e ARP-1 sono due fattori trascrizionali

5. *Discussione e conclusioni*

coinvolti nell'attivazione/repressione dei geni che codificano per la famiglia delle apolipoproteine, di cui CLU fa parte¹⁴³. L'analisi ha permesso inoltre di identificare fattori di trascrizione unici di P2, come SOX2. Questa è una proteina che svolge un ruolo critico nella definizione e nel mantenimento del tipo cellulare durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto^{40,144,145}. Possiamo speculare che CLU 2, normalmente represso nelle cellule, possa essere up-regolato attraverso SOX2 in risposta a segnali cellula/tessuto specifici implicati nel processo di sviluppo e differenziamento cellulare.

Per dimostrare che P2 fosse effettivamente un promotore è stata valutata la capacità della TBP di legare tale sequenza, poiché è noto che la TBP lega il solco minore di una regione promotrice indipendentemente dalla presenza della TATA box¹⁴⁶. Mediante esperimenti di ChIP è stato dimostrato la TBP lega le sequenze P1 e P2. I saggi di luciferasi hanno evidenziato che l'attività di P1, già rilevabile in condizioni di controllo, aumenta in seguito al trattamento AZDC-TSA. Per contro, l'attività di P2 non è rilevabile in condizioni di controllo, ma aumenta significativamente in seguito alla somministrazione di AZDC-TSA. Nell'insieme i dati sperimentali supportano l'idea che P2 è un promotore genuino, silente nelle cellule prostatiche in condizioni di controllo, ma attivabile in seguito alla somministrazione di farmaci epigenetici.

Sulla base dei risultati ottenuti sono stati studiati i meccanismi epigenetici responsabili dell'incremento di attività di P1 e P2 in seguito alla somministrazione di TSA e AZDC. È noto che la struttura della cromatina è essenziale per la regolazione trascrizionale di un gene e tra i possibili meccanismi epigenetici responsabili della modificazione della struttura, i più conosciuti sono la metilazione del DNA a livello delle isole CpG e la modificazione post-traduzionale delle code istoniche associate alle sequenze dei promotori. L'analisi bioinformatica condotta ha evidenziato la presenza di un'isola CpG nell'intorno di P1 che è risultata essere non metilata nei fibroblasti e metilata nelle cellule epiteliali prostatiche. Lo stato di metilazione dell'isola CpG potrebbe spiegare, almeno in parte, i livelli più bassi di mRNA e di proteina CLU che si ritrovano nelle cellule epiteliali prostatiche rispetto ai fibroblasti. Poiché i trattamenti epigenetici a breve termine non modificano lo stato di metilazione dell'isola CpG, se ne deduce che la metilazione diretta del DNA debba essere considerata un meccanismo di regolazione a lungo termine ereditabile e responsabile della parziale repressione di CLU nelle cellule prostatiche epiteliali rispetto ai fibroblasti, ma non può essere associata all'up-regolazione di CLU che si osserva in seguito alla somministrazione di TSA e AZDC-TSA ad alte dosi e per tempi ridotti. Le modificazioni

degli istoni rappresentano invece, un meccanismo di regolazione epigenetica più dinamico e flessibile che modifica in maniera reversibile l'accessibilità della cromatina per fattori di trascrizione in risposta a stimoli esterni (somministrazione di farmaci, condizioni ambientali, stress di varia natura)¹⁴⁷. Tra le varie modifiche, l'H3K9ac è tra quelle più predittive per il legame e la trascrizione da parte dell'RNAPolimerasi II, mentre l'H3K27me3 è una modifica associata a uno stato di cromatina repressa e inaccessibile. Attraverso esperimenti di ChIP è stato dimostrato che a livello dei due promotori, il trattamento AZDC-TSA da un lato aumenta l'acetilazione della lisina 9 dell'istone H3 mentre dall'altro riduce la trimetilazione della lisina 27 dello stesso istone. Entrambe queste modificazioni portano ad un cambio conformazionale della cromatina da condensata a rilassata, inducendo la trascrizione di CLU 1 e CLU 2. È da notare che nelle DU145 si osserva la maggior sintesi di trascritto per CLU 2, associata da una maggior variazione delle modifiche H3K9ac e H3K27me3 e da un maggior reclutamento della TBP sul promotore. Tutte queste evidenze sperimentali supportano il fatto che le modificazioni post-traduzionali dell'istone H3 sono direttamente coinvolte nel meccanismo di regolazione trascrizionale di CLU 2 a partire dal promotore P2.

Nella terza parte di questo lavoro di tesi si è focalizzata l'attenzione sul ruolo svolto da CLU nel signaling di NF-kB. Avvalendosi di uno studio microarray condotto su biopsie di tessuto prostatico umano, sono stati analizzati i livelli d'espressione di CLU e p65 in campioni sani e tumorali. Quello che emerge da quest'analisi è che l'alterazione di CLU è un evento precoce nella progressione del PCa, in quanto già nei tumori primari si osserva una diminuzione significativa dei livelli di CLU che decresce ulteriormente nelle metastasi. Invece, l'alterazione di p65 è un evento più tardivo nella progressione del tumore, infatti si osserva un aumento dei livelli di p65 solo nei tumori metastatizzati, mentre non si osservano variazioni apprezzabili quando si confronta il tessuto normale con i tumori primari. Poiché nei tumori CRPCa si ha contemporaneamente una riduzione di CLU e un aumento di p65, è stata scelta la linea cellulare PC3 come modello per studiare il ruolo di CLU nel processo di metastatizzazione indotto da NF-kB. Infatti, tra tutte le linee cellulari prostatiche analizzate, le PC3 sono quelle che esprimono i minori livelli di CLU e hanno, inoltre, la peculiarità di avere la via di NF-kB costitutivamente attiva. In queste cellule sono stati condotti esperimenti di sovraespressione stabile e transiente della forma proteica di CLU di 449 aa, nonché di silenziamento in forma transiente per valutare gli effetti su p65. Da questi esperimenti emerge che la sovraespressione in forma stabile di CLU determina una riduzione della proliferazione

5. *Discussione e conclusioni*

delle cellule e un rallentamento nella progressione del ciclo cellulare (blocco G₀/G₁). Parallelamente, si osserva un decremento significativo dei livelli di proteina p65 nei cloni PC3_{CLU} rispetto ai cloni PC3_{mock}. È stato inoltre osservato che nei cloni PC3_{CLU} il fattore di trascrizione ha una localizzazione prettamente citosolica, a differenza dei cloni PC3_{mock} in cui la localizzazione è prevalentemente nucleare, suggerendo la possibilità che l'espressione di CLU sia richiesta per mantenere NF-κB in uno stato trascrizionalmente inattivo. Le manovre di sovraespressione e silenziamento in forma transiente non modificano i livelli di p65.

Tra le modifiche post-traduzionali, la fosforilazione della serina 536 è quella che più si associa ad uno stato trascrizionalmente attivo di p65¹¹³. Contemporaneamente alla sovraespressione di CLU, sia essa condotta in forma stabile che in forma transiente, si osserva una diminuzione della frazione di p65 fosforilata sulla serina 536 ed una riduzione dell'attività trascrizionale. Per contro, in seguito al silenziamento di CLU, la frazione di p65 fosforilata aumenta in maniera significativa, contemporaneamente ad un aumento di attività trascrizionale di NF-κB. In questi modelli sperimentali sono stati inoltre analizzati i livelli di espressione di alcuni geni regolati da NF-κB, che sono coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare, presupposto per la metastatizzazione¹²⁷⁻¹²⁹. In accordo con i dati di attività trascrizionale di NF-κB, si osserva che da una parte la sovraespressione transiente di CLU determina una diminuzione dei livelli di questi geni (in particolare uPA e CTSB), mentre dall'altra il silenziamento di CLU ne determina un aumento (in particolare MMP-9). È da sottolineare che in seguito alla sovraespressione stabile di CLU non sono state osservate variazioni dei livelli di espressione di uPA, CTSB, MMP-9. Poiché NF-κB è il principale fattore trascrizionale che regola questi geni, ma non è l'unico, si può ipotizzare che nel modello cellulare considerato, altri fattori di trascrizione entrino in gioco nella regolazione dell'espressione di questi geni.

Nell'insieme i dati sperimentali ottenuti mediante sovraespressione e silenziamento di CLU, indicano come la forma intracellulare della proteina ha un ruolo inibitorio nei confronti dell'attività del fattore trascrizionale NF-κB. Questo potrebbe avere una rilevanza nel processo di progressione del tumore verso la forma metastatica. Per valutare se l'azione è di tipo diretto, si è condotto un esperimento di co-immunoprecipitazione da cui è emerso che, CLU e p65 non interagiscono fisicamente tra loro. Si suppone quindi che l'azione di CLU non sia diretta sul fattore di trascrizione, ma piuttosto che possa interagire con qualche altro membro della via di segnalazione di NF-κB o con molecole appartenenti a signaling interconnessi a quello di NF-κB. Alcuni gruppi di ricerca sostengono che vi sia un'interazione

diretta tra CLU e la forma fosforilata dell'inibitore di p65, Ikb α ^{131,132}, ma non si può escludere la possibilità che CLU eserciti la sua azione ad un altro livello, ad esempio su una delle chinasi che agiscono sul pathway di NF-kB. È noto che chinasi quali la proteina chinasi-1 MAPK attivata (RSK1), il complesso IKK e AKT, più o meno direttamente, sono responsabili della fosforilazione di p65 sulla serina 536¹⁴⁸. Nonostante sia stato dimostrato che la chinasi RSK1, una volta attivata dalla proteina p53 fosforila p65, è difficile pensare che CLU possa agire a questo livello, almeno nel modello sperimentale utilizzato in questo lavoro di tesi, poiché le PC3 non esprimono p53¹⁴⁹. Al contrario, è plausibile supporre che CLU eserciti la sua azione a livello del complesso IKK o di AKT. Il complesso IKK è l'insieme di chinasi facente parte della via di segnalazione canonica di NF-kB. Su di esso convergono una serie di segnali intra- ed extra-cellulari, la cui attivazione determina la fosforilazione e la successiva degradazione di Ikb α oltre alla fosforilazione di p65. È possibile ipotizzare che CLU inibisca l'attivazione del complesso IKK. Le cellule PC3 sono caratterizzate da un'attivazione costitutiva della via di segnalazione di AKT a causa della delezione dell'inibitore PTEN¹⁵⁰. In queste cellule AKT esercita la sua azione fosforilando e attivando IKK α , che a sua volta è responsabile della fosforilazione di p65¹⁵¹. I dati riportati fino a questo momento non escludono la possibilità che CLU possa inibire l'attivazione di NF-kB in modo indiretto, attraverso l'inibizione di AKT. Queste rimangono solo ipotesi che necessitano di essere sperimentalmente confermate.

Riassumendo i dati riportati in questo lavoro di tesi dimostrano che:

- ✓ CLU 1 e CLU 2 sono presenti a differenti livelli in differenti linee cellulari;
- ✓ CLU 1 è più corto al 5' della sequenza depositata in NCBI con l'identificativo NM_001831 e la traduzione che ha inizio a partire dall'AUG presente sull'esone 2, porta alla produzione della forma proteica di 449 aa destinata alla secrezione, sCLU;
- ✓ CLU 2, a differenza di quanto riferito in NCBI in cui è riportata la dicitura di trascritto non codificante, viene tradotto a partire dall'AUG presente sull'esone 2 dando origine a sCLU;
- ✓ CLU 1 e CLU 2 pertanto codificano per la stessa proteina;
- ✓ la trascrizione di CLU 1 e di CLU 2 è regolata in modo indipendente attraverso due regioni promotrici differenti, rispettivamente definite in questo lavoro di tesi P1 e P2;
- ✓ P2 è un promotore funzionale, inattivo in cellule epiteliali prostatiche in condizioni basali, e attivabile attraverso la somministrazione di farmaci epigenetici;

5. *Discussione e conclusioni*

- ✓ il meccanismo responsabile dell'up-regolazione di CLU in seguito ai trattamenti epigenetici è la modificazione delle code istoniche associate alle regioni promotrici di CLU, mentre la metilazione del DNA è un cambiamento epigenetico a lungo termine ereditabile associato ai differenti livelli di espressione di CLU osservati nelle diverse linee cellulari;
- ✓ CLU interferisce con la via di segnalazione di NF- κ B inibendo l'attività trascrizionale di p53 con conseguente riduzione dell'espressione dei geni coinvolti nel processo di rimodellamento della matrice extracellulare, presupposto per la metastatizzazione;
- ✓ l'azione di CLU su p53 è indiretta in quanto non vi è interazione fisica tra queste due proteine all'interno della cellula.

6. Appendice

6.1 SOLUZIONI UTILIZZATE

Buffer fosfato (PBS)

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄.

Buffer fosfato di Dulbecco con calcio e magnesio (D-PBS)

PBS, 500 nM MgCl₂, 900 nM CaCl₂.

TAE Buffer

40 mM Tris-HCl pH 7.6, 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA.

Gel di agarosio 1%

1% (p/v) di agarosio in TAE buffer.

Gel di poliacrilammide 12%

Running gel (Vf = 20 mL)

6.1 mL H₂O, 5 mL Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 150 µL SDS 10%, 8 mL Acrilammide 30%, 200 µL APS, 20 µL TEMED.

Stacking gel (Vf = 20 mL)

4.1 mL H₂O, 720 µL Tris-HCl 1 M pH 6.8, 58 µL SDS 10%, 1 mL Acrilammide 30%, 60 µL APS, 6 µL TEMED.

Laemmli Buffer

10% SDS, 10 mM DTT, 20 % glicerolo, 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.05% blu di bromofenolo.

Running Buffer

25 mM Tris, 200 mM glicina, 0.1% SDS.

Blotting Buffer

25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanolo.

Buffer salino Tris (TBS)

6. Appendice

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl.

Buffer salino Tris e Tween 20 (TTBS)

50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20.

Read Ponceau

0.1% (p/v) Red ponceau, 5% acido acetico.

Acido Tricloro Acetico (TCA)

0.3% (p/v) TCA in H₂O.

Mowiol

3% glicerolo 3%, 0.13% mowiol 0.13%, 130 mM Tris-HCl pH 8.5.

6.2 UNITÀ DI MISURA

In questo lavoro di tesi le unità di misura sono espresse secondo il sistema metrico internazionale, mentre è stata adottata la dizione americana per quanto riguarda il separatore dei decimali (.) e delle migliaia (,).

7. Bibliografia

1. Rosenberg, M.E. & Silkensen, J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 633-45 (1995).
2. Trougakos, I.P. & Gonos, E.S. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1430-48 (2002).
3. Shannan, B. et al. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* **13**, 12-9 (2006).
4. Fritz, I.B., Burdzy, K., Setchell, B. & Blaschuk, O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* **28**, 1173-88 (1983).
5. Jenne, D.E. & Tschopp, J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7123-7 (1989).
6. Wong, P. et al. Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J Biol Chem* **268**, 5021-31 (1993).
7. Ling, I.F., Bhongsatiern, J., Simpson, J.F., Fardo, D.W. & Estus, S. Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk. *PLoS One* **7**, e33923 (2012).
8. Prochnow, H. et al. Non-secreted clusterin isoforms are translated in rare amounts from distinct human mRNA variants and do not affect Bax-mediated apoptosis or the NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One* **8**, e75303 (2013).
9. Andersen, C.L. et al. Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1039-48 (2007).
10. Cochrane, D.R., Wang, Z., Muramaki, M., Gleave, M.E. & Nelson, C.C. Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *J Biol Chem* **282**, 2278-87 (2007).
11. Schepeler, T., Mansilla, F., Christensen, L.L., Orntoft, T.F. & Andersen, C.L. Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling. *J Mol Signal* **2**, 6 (2007).
12. Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J. & Boothman, D.A. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* **278**, 11590-600 (2003).
13. Wong, P. et al. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem* **221**, 917-25 (1994).
14. Michel, D., Chatelain, G., North, S. & Brun, G. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* **328 (Pt 1)**, 45-50 (1997).
15. Jones, S.E. & Jomary, C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 427-31 (2002).
16. Park, J. et al. Hypoxia inducible factor-1alpha directly regulates nuclear clusterin transcription by interacting with hypoxia response elements in the clusterin promoter. *Mol Cells* **37**, 178-86 (2014).
17. Takeuchi, A. et al. Insulin-like growth factor-I induces CLU expression through Twist1 to promote prostate cancer growth. *Mol Cell Endocrinol* **384**, 117-25 (2014).
18. Shiota, M. et al. Clusterin mediates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate cancer cells. *Cancer Res* **72**, 5261-72 (2012).
19. Corvetta, D. et al. Physical interaction between MYCN oncogene and polycomb repressive complex 2 (PRC2) in neuroblastoma: functional and therapeutic implications. *J Biol Chem* **288**, 8332-41 (2013).

7. Bibliografia

20. Klovov, D. et al. Low dose IR-induced IGF-1-sCLU expression: a p53-repressed expression cascade that interferes with TGFbeta1 signaling to confer a pro-survival bystander effect. *Oncogene* **32**, 479-90 (2013).
21. Shiota, M. et al. Clusterin is a critical downstream mediator of stress-induced YB-1 transactivation in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **9**, 1755-66 (2011).
22. Cervellera, M. et al. Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J Biol Chem* **275**, 21055-60 (2000).
23. Rauhala, H.E., Porkka, K.P., Saramaki, O.R., Tammela, T.L. & Visakorpi, T. Clusterin is epigenetically regulated in prostate cancer. *Int J Cancer* **123**, 1601-9 (2008).
24. Yang, G. et al. Epigenetic and immunohistochemical characterization of the Clusterin gene in ovarian tumors. *Arch Gynecol Obstet* **287**, 989-95 (2013).
25. Nestheide, S., Bridge, J.A., Barnes, M., Frayer, R. & Sumegi, J. Pharmacologic inhibition of epigenetic modification reveals targets of aberrant promoter methylation in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 1437-46 (2013).
26. Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A. & Salminen, A. Valproic acid stimulates clusterin expression in human astrocytes: Implications for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **475**, 64-8 (2010).
27. Suuronen, T., Nuutinen, T., Ryhanen, T., Kaarniranta, K. & Salminen, A. Epigenetic regulation of clusterin/apolipoprotein J expression in retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 397-401 (2007).
28. Hellebrekers, D.M. et al. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Res* **67**, 4138-48 (2007).
29. Wang, C. et al. EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res* **72**, 315-24 (2012).
30. Kirszbaum, L. et al. Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. *EMBO J* **8**, 711-8 (1989).
31. Lakins, J. et al. Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* **273**, 27887-95 (1998).
32. Choi-Miura, N.H., Takahashi, Y., Nakano, Y., Tobe, T. & Tomita, M. Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). *J Biochem* **112**, 557-61 (1992).
33. Kapron, J.T. et al. Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin. *Protein Sci* **6**, 2120-33 (1997).
34. O'Sullivan, J., Whyte, L., Drake, J. & Tenniswood, M. Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 914-27 (2003).
35. Reddy, K.B., Jin, G., Karode, M.C., Harmony, J.A. & Howe, P.H. Transforming growth factor beta (TGF beta)-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry* **35**, 6157-63 (1996).
36. Yang, C.R. et al. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5907-12 (2000).
37. Scaltriti, M., Santamaria, A., Paciucci, R. & Bettuzzi, S. Intracellular clusterin induces G2-M phase arrest and cell death in PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**, 6174-82 (2004).
38. Moretti, R.M. et al. Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 10325-33 (2007).

39. Nizard, P. et al. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic* **8**, 554-65 (2007).
40. Kang, S.W. et al. Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells. *Exp Cell Res* **309**, 305-15 (2005).
41. Romero, P. et al. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**, 38-48 (2001).
42. Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-4 (1991).
43. Wilson, M.R. & Easterbrook-Smith, S.B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* **25**, 95-8 (2000).
44. Bailey, R.W., Dunker, A.K., Brown, C.J., Garner, E.C. & Griswold, M.D. Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry* **40**, 11828-40 (2001).
45. de Silva, H.V., Harmony, J.A., Stuart, W.D., Gil, C.M. & Robbins, J. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* **29**, 5380-9 (1990).
46. Boggs, L.N. et al. Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem* **67**, 1324-7 (1996).
47. Park, D.C. et al. Clusterin interacts with Paclitaxel and confer Paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Neoplasia* **10**, 964-72 (2008).
48. Wilson, M.R. & Easterbrook-Smith, S.B. Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG. *Biochim Biophys Acta* **1159**, 319-26 (1992).
49. Poon, S., Treweek, T.M., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. & Carver, J.A. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett* **513**, 259-66 (2002).
50. Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Rybchyn, M.S., Carver, J.A. & Wilson, M.R. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* **39**, 15953-60 (2000).
51. Poon, S. et al. Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *J Biol Chem* **277**, 39532-40 (2002).
52. Wyatt, A., Yerbury, J., Poon, S., Dabbs, R. & Wilson, M. Chapter 6: The chaperone action of Clusterin and its putative role in quality control of extracellular protein folding. *Adv Cancer Res* **104**, 89-114 (2009).
53. Lindner, R.A., Kapur, A. & Carver, J.A. The interaction of the molecular chaperone, alpha-crystallin, with molten globule states of bovine alpha-lactalbumin. *J Biol Chem* **272**, 27722-9 (1997).
54. Lindner, R.A., Kapur, A., Mariani, M., Titmuss, S.J. & Carver, J.A. Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action. *Eur J Biochem* **258**, 170-83 (1998).
55. Lindner, R.A., Treweek, T.M. & Carver, J.A. The molecular chaperone alpha-crystallin is in kinetic competition with aggregation to stabilize a monomeric molten-globule form of alpha-lactalbumin. *Biochem J* **354**, 79-87 (2001).
56. Wyatt, A.R. et al. Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3919-31 (2011).
57. Rohne, P., Prochnow, H., Wolf, S., Renner, B. & Koch-Brandt, C. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cell Physiol Biochem* **34**, 1626-39 (2014).
58. Xie, D. et al. Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma. *Cancer* **103**, 277-83 (2005).

7. Bibliografia

59. Aigelsreiter, A. et al. Clusterin expression in cholestasis, hepatocellular carcinoma and liver fibrosis. *Histopathology* **54**, 561-70 (2009).
60. Kang, Y.K., Hong, S.W., Lee, H. & Kim, W.H. Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* **35**, 1340-6 (2004).
61. Miyake, H., Hara, S., Arakawa, S., Kamidono, S. & Hara, I. Over expression of clusterin is an independent prognostic factor for nonpapillary renal cell carcinoma. *J Urol* **167**, 703-6 (2002).
62. Parczyk, K., Pilarsky, C., Rachel, U. & Koch-Brandt, C. Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **120**, 186-8 (1994).
63. Busam, K.J. et al. Clusterin expression in primary and metastatic melanoma. *J Cutan Pathol* **33**, 619-23 (2006).
64. Miyake, H., Hara, I., Kamidono, S. & Gleave, M.E. Synergistic chemsensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res* **7**, 4245-52 (2001).
65. Redondo, M. et al. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* **157**, 393-9 (2000).
66. Xie, M.J. et al. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas* **25**, 234-8 (2002).
67. Santilli, G., Aronow, B.J. & Sala, A. Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity. *J Biol Chem* **278**, 38214-9 (2003).
68. Thomas-Tikhonenko, A. et al. Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo. *Cancer Res* **64**, 3126-36 (2004).
69. Zhang, L.Y. et al. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* **9**, 650-4 (2003).
70. Rodriguez-Pineiro, A.M. et al. Secreted clusterin in colon tumor cell models and its potential as diagnostic marker for colorectal cancer. *Cancer Invest* **30**, 72-8 (2012).
71. Panico, F., Rizzi, F., Fabbri, L.M., Bettuzzi, S. & Luppi, F. Clusterin (CLU) and lung cancer. *Adv Cancer Res* **105**, 63-76 (2009).
72. Chen, T. et al. Clusterin-mediated apoptosis is regulated by adenomatous polyposis coli and is p21 dependent but p53 independent. *Cancer Res* **64**, 7412-9 (2004).
73. Gleason, D.F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* **50**, 125-8 (1966).
74. Humphrey, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* **17**, 292-306 (2004).
75. Culig, Z. & Bartsch, G. Androgen axis in prostate cancer. *J Cell Biochem* **99**, 373-81 (2006).
76. Houston, B., Chisholm, G.D. & Habib, F.K. Evidence that human prostatic 5 alpha-reductase is located exclusively in the nucleus. *FEBS Lett* **185**, 231-5 (1985).
77. Balk, S.P. & Knudsen, K.E. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal* **6**, e001 (2008).
78. De Marzo, A.M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **7**, 256-69 (2007).
79. Schatteman, P.H., Hoekx, L., Wyndaele, J.J., Jeuris, W. & Van Marck, E. Inflammation in prostate biopsies of men without prostatic malignancy or clinical

- prostatitis: correlation with total serum PSA and PSA density. *Eur Urol* **37**, 404-12 (2000).
80. Gerstenbluth, R.E. et al. Distribution of chronic prostatitis in radical prostatectomy specimens with up-regulation of bcl-2 in areas of inflammation. *J Urol* **167**, 2267-70 (2002).
 81. Di Silverio, F. et al. Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur Urol* **43**, 164-75 (2003).
 82. Gurel, B. et al. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23**, 847-56 (2014).
 83. Burton, A.J. et al. Metabolic imbalance and prostate cancer progression. *Int J Mol Epidemiol Genet* **1**, 248-71 (2010).
 84. De Marzo, A.M., Nakai, Y. & Nelson, W.G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* **25**, 398-400 (2007).
 85. Mueller, M.M. & Fusenig, N.E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 839-49 (2004).
 86. Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res* **1**, 482-97 (2011).
 87. Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z. & Ricke, W.A. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* **107**, 1-10 (2003).
 88. Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P.S. & Gleave, M.E. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res* **60**, 2547-54 (2000).
 89. Steinberg, J. et al. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **3**, 1707-11 (1997).
 90. Rizzi, F. & Bettuzzi, S. Targeting Clusterin in prostate cancer. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 9**, 265-74 (2008).
 91. Bettuzzi, S. et al. Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res* **60**, 28-34 (2000).
 92. Rizzi, F. & Bettuzzi, S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* **17**, R1-17 (2010).
 93. Varisli, L. Identification of new genes downregulated in prostate cancer and investigation of their effects on prognosis. *Genet Test Mol Biomarkers* **17**, 562-6 (2013).
 94. Ribeiro, F.R. et al. Comparison of chromosomal and array-based comparative genomic hybridization for the detection of genomic imbalances in primary prostate carcinomas. *Mol Cancer* **5**, 33 (2006).
 95. Sun, J. et al. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *Prostate* **67**, 692-700 (2007).
 96. Dong, J.T. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* **20**, 173-93 (2001).
 97. Sala, A. et al. Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis. *Adv Cancer Res* **105**, 115-32 (2009).
 98. Scaltriti, M. et al. Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer. *Int J Cancer* **108**, 23-30 (2004).
 99. Tomlins, S.A. et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* **39**, 41-51 (2007).

7. Bibliografia

100. Pins, M.R. et al. Clusterin as a possible predictor for biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy with intermediate Gleason scores: a preliminary report. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **7**, 243-8 (2004).
101. July, L.V. et al. Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy. *Prostate* **50**, 179-88 (2002).
102. Greenberg, N.M. et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3439-43 (1995).
103. Kaplan-Lefko, P.J. et al. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate* **55**, 219-37 (2003).
104. McLaughlin, L. et al. Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest* **106**, 1105-13 (2000).
105. Bettuzzi, S. et al. Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumourigenesis and metastatic spread. *Oncogene* **28**, 4344-52 (2009).
106. Miyake, H., Chi, K.N. & Gleave, M.E. Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **6**, 1655-63 (2000).
107. Sowery, R.D. et al. Clusterin knockdown using the antisense oligonucleotide OGX-011 re-sensitizes docetaxel-refractory prostate cancer PC-3 cells to chemotherapy. *BJU Int* **102**, 389-97 (2008).
108. Chi, K.N. et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **97**, 1287-96 (2005).
109. Chi, K.N. et al. Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* **28**, 4247-54 (2010).
110. Saad, F. et al. Randomized phase II trial of Custirsen (OGX-011) in combination with docetaxel or mitoxantrone as second-line therapy in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer progressing after first-line docetaxel: CUOG trial P-06c. *Clin Cancer Res* **17**, 5765-73 (2011).
111. Trougakos, I.P. et al. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin Cancer Res* **15**, 48-59 (2009).
112. Chaiwatanasirikul, K.A. & Sala, A. The tumour-suppressive function of CLU is explained by its localisation and interaction with HSP60. *Cell Death Dis* **2**, e219 (2011).
113. Hoesel, B. & Schmid, J.A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **12**, 86 (2013).
114. Sun, S.C. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* **21**, 71-85 (2011).
115. Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R. & Li, Z.W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**, 301-10 (2002).
116. Baldwin, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* **107**, 241-6 (2001).
117. Rayet, B. & Gelinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**, 6938-47 (1999).
118. Suh, J. & Rabson, A.B. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* **91**, 100-17 (2004).
119. Perkins, N.D. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 121-32 (2012).

120. da Silva, H.B. et al. Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. *Prostate Cancer* **2013**, 920612 (2013).
121. Jin, R. et al. Inhibition of NF-kappa B signaling restores responsiveness of castrate-resistant prostate cancer cells to anti-androgen treatment by decreasing androgen receptor-variant expression. *Oncogene* **34**, 3700-10 (2015).
122. Jin, R. et al. NF-kappaB gene signature predicts prostate cancer progression. *Cancer Res* **74**, 2763-72 (2014).
123. Palayoor, S.T., Youmell, M.Y., Calderwood, S.K., Coleman, C.N. & Price, B.D. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* **18**, 7389-94 (1999).
124. Gasparian, A.V. et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* **115**, 141-51 (2002).
125. Suh, J. et al. Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* **52**, 183-200 (2002).
126. Sweeney, C. et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* **10**, 5501-7 (2004).
127. Bien, S. et al. Nuclear factor-kappaB mediates up-regulation of cathepsin B by doxorubicin in tumor cells. *Mol Pharmacol* **65**, 1092-102 (2004).
128. Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S. & Sarkar, F.H. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* **67**, 3310-9 (2007).
129. Huang, S., Pettaway, C.A., Uehara, H., Bucana, C.D. & Fidler, I.J. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* **20**, 4188-97 (2001).
130. Rao, J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* **3**, 489-501 (2003).
131. Devauchelle, V. et al. Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **177**, 6471-9 (2006).
132. Essabbani, A., Margottin-Goguet, F. & Chiocchia, G. Identification of clusterin domain involved in NF-kappaB pathway regulation. *J Biol Chem* **285**, 4273-7 (2010).
133. Takase, O. et al. Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. *Kidney Int* **73**, 567-77 (2008).
134. Chayka, O. et al. Clusterin, a haploinsufficient tumor suppressor gene in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **101**, 663-77 (2009).
135. Panico, F. et al. Prognostic role of clusterin in resected adenocarcinomas of the lung. *Lung Cancer* **79**, 294-9 (2013).
136. Zoubeidi, A. et al. Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* **8**, 119-30 (2010).
137. Scaltriti, M. et al. Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* **91**, 1842-50 (2004).
138. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8 (2001).

7. Bibliografia

139. Rivera-Gonzalez, G.C. et al. Retinoic acid and androgen receptors combine to achieve tissue specific control of human prostatic transglutaminase expression: a novel regulatory network with broader significance. *Nucleic Acids Res* **40**, 4825-40 (2012).
140. Rizzi, F. et al. A novel gene signature for molecular diagnosis of human prostate cancer by RT-qPCR. *PLoS One* **3**, e3617 (2008).
141. Tolner, B., Roy, K. & Sirotnak, F.M. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene* **211**, 331-41 (1998).
142. Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F.M. & Martinez, E. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389**, 52-65 (2007).
143. Ladias, J.A. et al. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J Biol Chem* **267**, 15849-60 (1992).
144. Pahnke, J. et al. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor induces genes regulating migration and differentiation of neuronal progenitor cells. *Exp Cell Res* **297**, 484-94 (2004).
145. Cordero-Llana, O. et al. Clusterin secreted by astrocytes enhances neuronal differentiation from human neural precursor cells. *Cell Death Differ* **18**, 907-13 (2011).
146. Pugh, B.F. & Tjian, R. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**, 1935-45 (1991).
147. Jenuwein, T. & Allis, C.D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80 (2001).
148. Viatour, P., Merville, M.P., Bours, V. & Chariot, A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* **30**, 43-52 (2005).
149. Carroll, A.G., Voeller, H.J., Sugars, L. & Gelmann, E.P. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* **23**, 123-34 (1993).
150. Whang, Y.E. et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5246-50 (1998).
151. Dan, H.C. et al. Akt-dependent regulation of NF-kappaB is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev* **22**, 1490-500 (2008).