

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare

Ciclo XXIII

**REGOLAZIONE EPIGENETICA DELL'ESPRESSIONE
DI CLUSTERINA IN LINEE CELLULARI UMANE DI
CANCRO PROSTATICO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Gian Luigi Rossi

Tutor:

Chiar.mo Prof. Saverio Bettuzzi

Dottoranda:

Mariangela Coletta

*Con affetto,
a Braccarmandugo
e Biancaepoineve*

INDICE

SOMMARIO	9
Capitolo 1: INTRODUZIONE	13
1.1 Il tumore della prostata	15
1.1.1 Cenni di anatomia e fisiologia della prostata	15
1.1.2 Epidemiologia ed eziologia del tumore della prostata	18
1.1.3 Diagnosi e classificazione istologica del tumore prostatico	19
1.1.4 Adenocarcinoma prostatico e androgeni	23
1.1.5 Espressione genica nel cancro della prostata	14
1.2 La Clusterina	31
1.2.1 Cenni storici	31
1.2.2 Gene e promotore	34
1.2.3 Varianti trascrizionali	37
Isoforma 1 (CLU1)	38
Isoforma 2 (CLU2)	39
Isoforma 11036	41
Messaggero alternativo descritto da Leskov	41
1.2.4 Forme proteiche	42
Clusterina secreta (sCLU)	42
Clusterina intracellulare (nCLU e cCLU)	60
1.3 Clusterina e tumorigenesi	63
1.3.1 Clusterina, apoptosi e regolazione del ciclo cellulare	63
1.3.2 Clusterina e motilità cellulare	69
1.3.3 Espressione di Clusterina in cellule tumorali, modelli tumorali murini e tumori	72
1.4 Regolazione dell'espressione di Clusterina	85
1.4.1 Regolazione di Clusterina da parte di oncogeni trasformanti: prime evidenze sperimentali	85

1.4.2	Regolazione di Clusterina da parte di fattori di trascrizione proto-oncogenici	86
	c-MYC	86
	MYB	87
	NF- κ B	88
	Egr1	89
	Stat1	89
1.4.3	Regolazione epigenetica di Clusterina: stato dell'arte	90
 Capitolo 2: SCOPO DELLA TESI		95
 Capitolo 3: MATERIALI E METODI		99
3.1	Analisi dell'espressione genica delle isoforme trascrizionali di CLU in linee cellulari umane normali, immortalizzate e tumorali	101
3.1.1	Caratteristiche delle linee cellulari umane utilizzate	101
3.1.2	Mantenimento delle linee cellulari utilizzate	103
3.1.3	Estrazione dell'RNA	103
3.1.4	RT-PCR	104
3.2	Analisi 'in silico' di regioni regolatrici del gene CLU	107
3.3	Somministrazione di farmaci epigenetici	107
3.3.1	Analisi dei trascritti	108
3.3.2	Analisi delle proteine	108
	Estrazione e dosaggio delle proteine	108
	SDS-PAGE e Western Blot	109
	Immunocitochimica	111
3.3.3	Analisi del DNA genomico	112
	Methylation Specific PCR (MSP)	112
 Capitolo 4: RISULTATI		117
4.1	Analisi dell'espressione genica relativa delle varianti trascrizionali di CLU in diverse linee cellulari umane	119

4.2	Analisi <i>'in silico'</i> di regioni regolatrici del gene CLU	120
4.3	Effetti della somministrazione di farmaci epigenetici in linee cellulari di cancro prostatico	121
4.3.1	Effetti sull'espressione genica delle varianti trascrizionali di CLU	121
4.3.2	Effetti sul profilo di espressione proteica di CLU	122
4.3.3	Effetti sulla localizzazione di CLU	125
4.3.4	Effetti a livello cellulare	127
4.3.5	Stato di metilazione delle isole CpG presenti nel promotore di CLU	129
	Capitolo 5: DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	133
	BIBLIOGRAFIA	145

SOMMARIO

La Clusterina (CLU) è un proteina ubiquitaria, presente nella maggior parte dei fluidi biologici, che è implicata in quasi tutti i processi fisiologici fondamentali dell'organismo umano e nello sviluppo di diverse malattie come il cancro e l'Alzheimer. Il gene umano *CLU* è costituito da 9 esoni e si colloca nella regione centrale del braccio corto del cromosoma 8 (8p21-p12), zona frequentemente deleta nel cancro della prostata. Un recente aggiornamento in GenBank ha evidenziato l'esistenza di due varianti trascrizionali della CLU umana (NM_001831 Isoforma 1; NM_203339.1 Isoforma 2), presenti esclusivamente nei primati, che hanno sostituito la precedente sequenza M64722.1. Queste isoforme condividono la sequenza nucleotidica dall'esone 2 all'esone 9 e la regione 3' non tradotta, ma possiedono un esone 1 diverso e specifico. Inoltre nel 2003 è stato descritto un ulteriore messaggero nel quale, in seguito ad un fenomeno di splicing alternativo, parte dell'esone 1 di quella che attualmente è Isoforma 1 sarebbe direttamente legato all'esone 3. Attualmente in letteratura sono descritte differenti forme proteiche di Clusterina caratterizzate da funzioni e localizzazioni cellulari differenti: la forma presecretoria (psCLU), la forma secreta (sCLU), la forma nucleare (nCLU). La traduzione a partire dall'AUG nell'esone 2, presente in entrambe le isoforme, genera un precursore citoplasmatico di circa 60 kDa (psCLU) che una volta processato porta alla produzione della proteina matura destinata alla secrezione s(CLU). sCLU si presenta come un eterodimero $\alpha\beta$ glicosilato di circa 75-80 kDa e si comporta come un chaperone molecolare ATP indipendente. La traduzione a partire dal codone d'inizio presente nel terzo esone, anch'esso comune ad entrambe le isoforme, genera invece una forma a localizzazione nucleare (nCLU o forma troncata)

con funzione proapoptotica del peso di 45-50 kDa. Ad oggi deve essere fatta ancora chiarezza sul processo che porta a partire da un unico gene alla trascrizione dei due differenti messaggeri e alla sintesi delle tre varianti proteiche. Inoltre, scarsi sono i dati sul loro possibile meccanismo specifico di azione.

In questo lavoro di tesi è stata valutata la distribuzione delle due isoforme di CLU e la presenza del messaggero alternativo proposto nel 2003 in diverse linee cellulari umane. Questa analisi non ha confermato eventi di splicing alternativo ma ha evidenziato una differente espressione delle due varianti trascrizionali di CLU: L'Isoforma 1 è costitutivamente espressa in tutte le linee analizzate, mentre l'Isoforma 2 risulta assente in tutte le linee tumorali prese in considerazione, aparendo quindi correlata in modo specifico agli eventi coinvolti nella trasformazione neoplastica. I dati emersi da questo primo studio ci hanno portato ad ipotizzare una regolazione differenziale dell'espressione di questi due trascritti che potrebbe derivare dalla presenza di regioni promotrici e di siti d'inizio trascrizione (TSS) differenti. Questa ipotesi coinvolgerebbe meccanismi di tipo epigenetico. Un'analisi "in silico" della regione genomica di *CLU* ha effettivamente rilevato la presenza di TSS e regioni promotrici differenti per le due isoforme ed ha inoltre individuato due isole CpG, potenzialmente oggetto di metilazione. In letteratura, sono riportati diversi lavori che propongono una regolazione di CLU per via epigenetica ma in nessuno di questi è stato preso in considerazione come questa possa eventualmente influire in modo differenziale sulla trascrizione delle due isoforme. Perciò si è proceduto trattando le linee cellulari di cancro prostatico PC3 e DU145 con tricostatina A (TSA), un inibitore delle istone deacetilasi (HDAC) di classe I e II e/o con 5-aza-2'-deossicitidina (5Aza-dC), un inibitore delle DNA metiltransferasi (DNMT), al fine di valutare gli effetti da essi indotti sull'espressione di CLU. È così emerso che tali

composti sono in grado di indurre in cellule tumorali prostatiche un rimodellamento della cromatina a livello delle regione promotrici di CLU che comporta: i) la riattivazione della trascrizione dell'Isoforma 2; ii) un incremento nella produzione e nella secrezione di sCLU; iii) la comparsa in DU145 di nCLU, che si localizza a livello nucleare inducendo queste cellule ad intraprendere il pathway di morte programmata per apoptosi. Nel complesso, i dati raccolti evidenziano che è presente una down-regolazione dell'espressione di CLU in cellule tumorali di prostata, particolarmente marcata a livello della trascrizione dell'Isoforma 2, che quale appare completamente repressa. I risultati ottenuti, visti nel loro insieme, portano ad ipotizzare che alla base di questo tipo di silenziamento genico vi siano meccanismi di regolazione epigenetica differenziali che agiscono probabilmente a livello di regioni genomiche diverse.

Capitolo 1: INTRODUZIONE

1.1 IL TUMORE DELLA PROSTATA

1.1.1 Cenni di anatomia e fisiologia della prostata

La prostata è un organo ghiandolare e fibromuscolare che circonda la porzione prossimale dell'uretra; è posta al di sotto del collo vescicale e davanti al retto (figura 1.1). L'organo ha la forma di una castagna con la base rivolta verso la vescica e l'apice verso il diaframma uro-genitale.

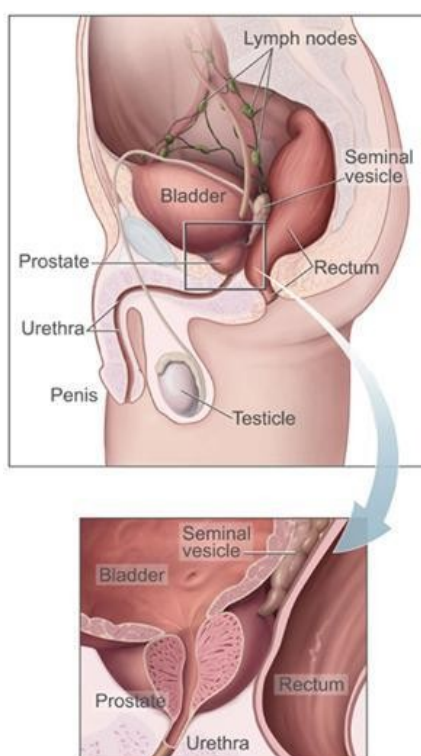


Figura 1.1: Sezione sagittale della pelvi maschile. Sono evidenti sede e rapporti della prostata con gli organi vicini.

La prostata, con le vescicole seminali, rappresenta l'organo sessuale secondario più importante nel maschio. Nei mammiferi queste ghiandole esocrine secernono numerosi prodotti il cui ruolo fisiologico resta tuttavia poco noto.

Introduzione

La secrezione prostatico-vescicolare costituisce quantitativamente e qualitativamente la principale porzione del plasma seminale. Oltre ad un ruolo nella produzione dell'eiaculato, per la prostata e per le sue secrezioni viene supposta un'importante funzione di barriera nei confronti di agenti patogeni infettanti.

Dal punto di vista istologico la prostata è costituita principalmente da ghiandole esocrine sostenute da uno stroma fibromuscolare. L'unità funzionale della prostata è l'acino ghiandolare, composto dal compartimento epiteliale e da quello stromale; il compartimento epiteliale è costituito da cellule secretorie, basali e neuroendocrine (Bonkoff *et al.*, 1996).

Le cellule epiteliali secretorie esprimono il recettore per gli androgeni e quello per l'antigene prostatico specifico (PSA); esse necessitano degli androgeni per mantenere il loro fenotipo differenziato (Lalani *et al.*, 1997).

Le cellule epiteliali basali sono separate dallo stroma tramite una membrana basale; esse comprendono anche cellule staminali. Queste ultime danno origine a tutti i tipi cellulari del parenchima epiteliale. Le cellule epiteliali basali non esprimono il recettore degli androgeni, se non a bassi livelli.

Lo stroma prostatico è costituito da cellule muscolari lisce, fibroblasti, vasi sanguigni, nervi e matrice extracellulare. Ci sono evidenze che una alterazione delle normali interazioni stroma-epitelio possa contribuire allo sviluppo dell'iperplasia, della neoplasia e della progressione tumorale nella prostata (Cunha *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2001). Studi recenti in modelli *in vitro* hanno dimostrato come lo stroma isolato da zone peri-tumorali possa modulare la morfologia ed il differenziamento delle cellule epiteliali (Hall *et al.*, 2002).

Macroscopicamente la ghiandola normale può essere suddivisa in tre diverse zone (McNeal, 1988) dalle quali si ritiene originino differenti patologie (figura 1.2):

- *zona periferica*, costituita prevalentemente da tessuto ghiandolare (circa il 75% del tessuto ghiandolare totale), è la zona da cui originano in genere i carcinomi;
- *zona centrale*, costituita da raggruppamenti di ghiandole (circa il 20-25% del tessuto ghiandolare) organizzate intorno ai dotti eiaculatori;
- *zona di transizione*, costituita da rare ghiandole che rappresentano circa il 5% dell'intera massa ghiandolare site in prossimità dello sbocco dei dotti eiaculatori dell'uretra prostatica. Da questa zona trae origine l'iperplasia prostatica benigna (IBP).

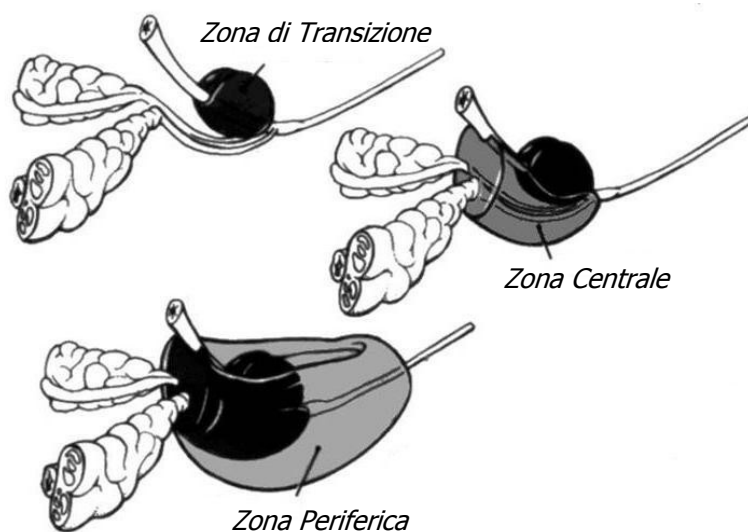


Figura 1.2: Suddivisione in zone della prostata umana.

1.1.2 Epidemiologia ed eziologia del tumore della prostata

Il tumore della prostata (CaP) rappresenta in Italia la neoplasia più frequentemente diagnosticata nel maschio adulto ed è la seconda causa di morte dopo il tumore del polmone. L'incidenza del CaP ha mostrato in questi anni una crescita notevole che è da mettere in relazione con due fattori rilevanti: l'invecchiamento progressivo della popolazione e l'aumento della pressione diagnostica, che hanno portato i tassi di incidenza a raddoppiare nel giro degli ultimi 10 anni. Le stime per l'Italia (fonte Istituto Superiore di Sanità ed Associazione Italiana Registro Tumori) indicano un totale di 23.518 nuovi casi diagnosticati ogni anno, mentre per quanto riguarda la mortalità nel 2002 si sono verificati 7.105 decessi per CaP.

Il rischio cumulativo (calcolato nel corso di tutta la vita calcolato fra 0 e 74 anni) è pari al 62,0‰ (1 caso ogni 16 uomini), mentre il rischio di morire è pari all'8,2‰. Non vi è dubbio tuttavia che l'eziologia del carcinoma prostatico sia multifattoriale e sia il risultato di una complessa interazione di fattori genetici ed ambientali con l'età e lo stato ormonale dei soggetti a rischio. Sono stati riconosciuti come fattori di rischio indipendenti l'età, la razza, le abitudini alimentari e il livello di androgeni circolanti. Si tratta di una patologia fortemente correlata all'età, di conseguenza il numero assoluto dei casi di carcinoma prostatico aumenta in relazione con l'aumento della prospettiva media di vita della popolazione.

Il carcinoma prostatico presenta una notevole variabilità di incidenza nelle diverse aree geografiche e nelle diverse razze: l'incidenza è alta nella popolazione afro-americana che vive negli Stati Uniti, mentre in alcuni paesi del Sud-Est asiatico si riscontrano tassi d'incidenza molto bassi, inferiori di dieci volte al tasso d'incidenza dell'America del Nord e di molti paesi dell'Europa (Silverbeg, 1987). Differenze nel tipo di dieta, nello stato socio-economico e nei livelli di ormoni attivi circolanti (DHT), possono contribuire alle variazioni razziali del tasso

di incidenza. L'aumento delle aspettative di vita delle popolazioni occidentali e la legittima aspirazione a standard di benessere e qualità di vita elevati hanno fatto sì che il carcinoma prostatico acquisisse maggiore rilevanza fino a divenire un problema medico e socio-economico prioritario nelle società industrializzate.

1.1.3 Diagnosi e classificazione istologica del tumore prostatico

Attualmente la diagnosi del carcinoma prostatico si basa essenzialmente sulle seguenti indagini:

- Esplorazione digito-rettale (DRE) durante la visita urologica, consigliata annualmente al raggiungimento del 50° anno di età insieme al dosaggio sierico del PSA (Antigene Prostatico Specifico). La scoperta di un innalzamento dei valori di PSA (Antigene Prostatico Specifico), non rappresenta una prova definitiva della presenza di cancro alla prostata, ma è la condizione che determina l'attivazione delle procedure di secondo livello finalizzate alla diagnosi di CaP.
- Ecografia prostatica transrettale (TRUS), eseguita in caso di DRE e PSA sospetto.
- Agobiopsia prostatica eseguita in tutti i casi in cui vi sia il sospetto di neoplasia prostatica alla DRE, alla TRUS o nei casi in cui il livello plasmatico del PSA superi i 4 ng/mL, seguita da esame istologico.

Sebbene ampiamente utilizzato nella pratica clinica, il PSA rappresenta un parametro poco specifico per la diagnosi di carcinoma prostatico. Infatti in circa il 30% dei pazienti il rialzo del PSA è dovuto ad eventi non correlati al tumore (infiammazione prostatica, iperplasia prostatica benigna, infezioni in corso, età dell'individuo), e pertanto questa proteina rappresenta in modo più corretto un marcatore tessuto specifico, piuttosto che un marker di neoplasia. D'altra parte è anche noto che il 30% di tutti i tumori diagnosticati

Introduzione

non mostrano un innalzamento del PSA e sono per questo denominati tumori "PSA-negative". Per aumentare la specificità diagnostica del PSA il valore soglia (cut-off clinico), può essere corretto per l'età del paziente o per il volume prostatico, "PSA density" (Benson *et al.*, 1992), oppure può essere misurata la velocità di crescita annuale del PSA, "PSA velocity" (Carter e Pearson, 1997). Un altro parametro normalmente impiegato nella pratica clinica, per discriminare meglio l'iperplasia prostatica dalla neoplasia è la misura del rapporto fra il PSA plasmatico libero ed il PSA totale. Elevati livelli di PSA libero e quindi del rapporto PSA libero/PSA totale, correlano maggiormente con la patologia benigna. In figura 1.3 si riporta l'algoritmo diagnostico diffusamente impiegato nella routine clinica.

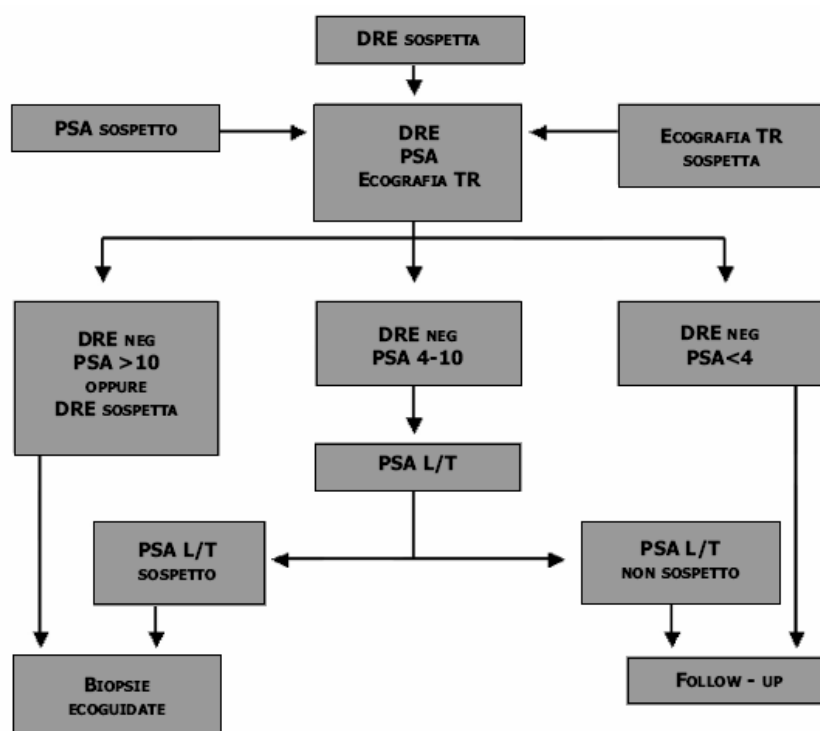


Figura 1.3: Diagnosi del tumore prostatico. Legenda: DRE = Esplorazione digito-rettale della prostata; Ecografia TR = Ecografia transrettale; PSA = Antigene Prostatico Specifico; PSA T = Antigene Prostatico Specifico totale; PSA L/T = Rapporto PSA Libero / PSA Totale (PSA ratio).

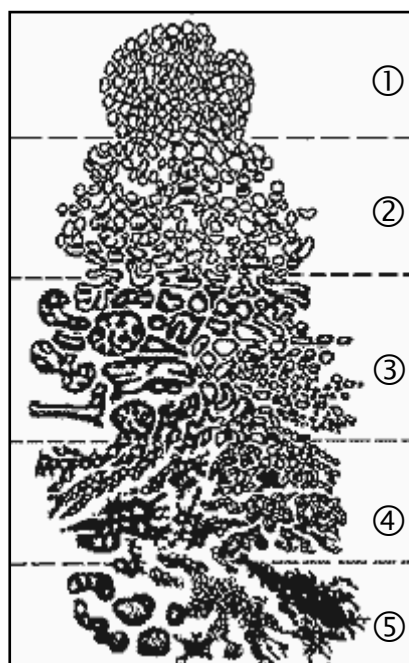
Il carcinoma della prostata origina in circa l'80% dei casi dalla zona periferica o caudale della ghiandola, per il restante 20% dalla zona centrale o dalla zona di transizione.

inizialmente la neoplasia si sviluppa all'interno della ghiandola, mentre le diffusionsi per contiguità linfatica ed ematica sono generalmente più tardive. La storia naturale di questo tumore è estremamente imprevedibile, infatti, non sempre le due possibili forme di progressione e cioè l'invasione locale organo-confinata e la formazione di metastasi si verificano consecutivamente e progressivamente in relazione alle dimensioni del tumore, ma possono essere indipendenti l'una dall'altra. Si ritiene che la gran parte dei tumori allo stato latente, ovvero non clinicamente manifesto, abbia un comportamento biologicamente poco aggressivo e che solo una ristretta porzione possa progredire verso la forma metastatica invasiva. Purtroppo le neoplasie dotate di comportamento aggressivo non sono attualmente distinguibili da quelle indolenti al momento della diagnosi e questo crea difficoltà nella gestione clinica del paziente. La refertazione istopatologica del tumore prostatico è necessaria per definirne il "*grading*" o differenza istologica rispetto al tessuto normale e la stadiazione, ossia l'estensione intra- ed extra-ghiandolare della patologia tumorale. Il sistema di riferimento internazionale utilizzato per la definizione del grado istologico del tumore è la classificazione secondo Gleason, che si basa sulla osservazione dell'architettura ghiandolare per valutare il grado di differenziamento e di crescita della neoplasia rispetto alla matrice stromale ed al tessuto sano (Gleason, 1966). La classificazione secondo Gleason prevede l'assegnazione di cinque gradi principali numerati progressivamente da 1 a 5, che identificano altrettanti diversi profili istologici (figura 1.4). L'architettura prostatica, l'organizzazione e la differenziazione ghiandolare vengono progressivamente persi passando dal grado 1 al grado 5. Nel corso

Introduzione

della refertazione anatomo-patologica i gradi sono assegnati al profilo istologico più frequente nel pezzo osservato, grado primario, ed al secondo più frequente, grado secondario. Dalla somma dei gradi assegnati alle due condizioni istologiche più frequenti si ottiene il punteggio complessivo, denominato "Gleason score", il cui valore è compreso tra 2 e 10. I carcinomi con "score" basso, ovvero compreso fra 2 e 4 sono di solito a crescita lenta e hanno una minore tendenza a metastatizzare; quelli con un punteggio compreso fra 5 e 7 sono moderatamente differenziati, ed hanno una evoluzione per lo più imprevedibile, mentre quelli con punteggio compreso fra 8 e 10 sono indifferenziati ed hanno un comportamento molto aggressivo.

La stadiazione indica convenzionalmente le dimensioni del tumore e se questo si è diffuso al di fuori del sito primario. La stadiazione patologica si basa sulla refertazione istologica dell'intera prostata dopo asportazione chirurgica. Il sistema "TNM" è il sistema internazionale di stadiazione di un tumore, che considera tre parametri: il volume del tumore e la sua estensione locale (T), l'interessamento o meno dei linfonodi loco-regionali (N) e l'esistenza o meno di metastasi a distanza (M).



- **Gleason 1:** Tumore composto da noduli di ghiandole ben delimitati, strettamente ravvicinate, uniformi, singole e separate l'una dall'altra.
- **Gleason 2:** Tumore ancora abbastanza circoscritto, ma con eventuale minima estensione delle ghiandole neoplastiche alla periferia del nodulo tumorale, nel tessuto prostatico non-neoplastico.
- **Gleason 3:** Tumore che infiltra il tessuto prostatico non-tumorale; le ghiandole presentano notevole variabilità di forma e dimensione.
- **Gleason 4:** Ghiandole tumorali con contorni mal definiti e fuse fra loro; possono essere presenti ghiandole cribriformi con bordi irregolari.
- **Gleason 5:** Tumore che non presenta differenziazione ghiandolare, ma è composto da cordoni solidi o da singole cellule.

Figura 1.4: Adenocarcinoma della prostata umana: quadri istologici secondo il grado Gleason. (Tratto da Dawson, 2003.)

1.1.4 Adenocarcinoma prostatico e androgeni

La neoplasia prostatica è un tumore androgeno-dipendente almeno nella sua fase iniziale. Il tessuto ghiandolare prostatico è sensibile al diidrotestosterone (DHT), che si forma a partire dal testosterone per azione della 5- α -riduttasi, enzima presente a livello della membrana plasmatica delle cellule prostatiche (Houston *et al.*, 1985).

Il DHT attraversa liberamente la membrana cellulare delle cellule prostatiche, quindi riconosce specificamente e lega con elevata affinità il proprio recettore intracellulare. Il complesso DHT-recettore, così formato, raggiunge il nucleo e si lega ad alcune sequenze specifiche dette ARE (Androgen Responsive Element), localizzate sul promotore del gene bersaglio, modulando così l'espressione genica ed inducendo la sintesi di proteine specifiche.

In seguito alla deprivazione di questi ormoni mediante somministrazione di antagonisti degli androgeni si ottiene un forte

Introduzione

decremento del volume dei tumori primari e delle metastasi nell'80% dei pazienti trattati. L'effetto terapeutico della deplezione androgenica è dovuto all'instaurarsi di un processo selettivo di morte cellulare programmata (apoptosi) nelle cellule androgeno-dipendenti. Tuttavia, dopo un periodo di risposta alla terapia, nella maggior parte dei casi il carcinoma prostatico riprende la sua crescita, nonostante i bassi livelli di androgeni circolanti, a causa della proliferazione di cellule prostatiche caratterizzate da un fenotipo androgeno-indipendente. Secondo Isaacs e collaboratori lo sviluppo del tumore androgeno-indipendente è frutto di una selezione clonale: in pratica entrambe le popolazioni cellulari, quella androgeno-dipendente e quella androgeno-indipendente, sarebbero compresenti sin dall'inizio nel tumore, ma la deplezione della popolazione androgeno-dipendente, per effetto del blocco androgenico, favorirebbe la crescita selettiva di quella androgeno-indipendente (Isaacs e Coffey, 1981). Pertanto la deprivazione androgenica, seppure al momento rappresenti l'unica opzione terapeutica in caso di tumore non organo-confinato, dovrebbe essere considerata a tutti gli effetti un trattamento palliativo.

1.1.5 Espressione genica nel cancro della prostata

Negli ultimi due decenni sono stati compiuti enormi progressi nell'identificazione delle basi molecolari che determinano l'insorgenza del cancro nell'uomo. Le anomalie all'origine del cancro si trovano nei geni che controllano il ciclo vitale di una cellula, vale a dire la sua divisione e la sua morte. Quando i geni coinvolti in questi fenomeni vengono danneggiati, il processo di divisione diventa incontrollabile e le cellule non muoiono al momento prestabilito. Due classi di geni hanno un ruolo importante nello sviluppo del cancro: gli oncogeni e gli oncosoppressori. In condizioni normali, o meglio, in cellule normali, lavorano insieme per controllare la proliferazione della

cellula. I proto-oncogeni sono i normali precursori degli oncogeni, essi hanno un ruolo fondamentale in diverse vie che regolano lo sviluppo embrionale, il rinnovo cellulare nel soggetto adulto, la differenziazione cellulare e la morte cellulare programmata (apoptosi). Se vengono danneggiati, a causa di mutazioni o modificazioni di vario genere, diventano oncogeni e causano la proliferazione incontrollata della cellula promuovendo lo sviluppo del cancro.

Al contrario degli oncogeni, gli oncosoppressori svolgono un compito di prevenzione della neoplasia, in quanto controllano la crescita cellulare. Poiché l'effetto della loro azione è opposto a quello degli oncogeni, sono anche chiamati anti-oncogeni. L'alterazione o la perdita della loro funzione porta alla trasformazione neoplastica.

Sono state identificate o ipotizzate diverse alterazioni nella struttura o nell'espressione di determinati geni e mutazioni che permettono alle cellule di sopravvivere agli stimoli di morte fornendo loro un vantaggio selettivo di crescita. La sopravvivenza delle cellule tumorali può essere indotta e mantenuta in seguito a perdita o modificazione delle funzioni del soppressore tumorale p53 (Shaffer e Scher, 2003), amplificazione del gene MDM2 (Mouse Double Minute 2), il cui prodotto è un regolatore negativo dei livelli di proteina p53, o in seguito a sbilanciamento nell'attività delle molecole pro-apoptotiche BAD (BCL2-Antagonist of cell Death) e BAX (BCL2-Associated X protein) o delle molecole anti-apoptotiche BCL-2 e BCL-xL (Reed, 2002; De Marzo *et al.*, 2004) mostrate in figura 1.5.

Nel cancro prostatico avanzato, la più frequente anomalia riportata in questo gruppo di molecole include la perdita del fenotipo wild-type p53 (Eastham *et al.*, 1995; Meyers *et al.*, 1998) e l'over-espressione di BCL2 (McDonnell *et al.*, 1992; Reed, 1998). Incrementati livelli di BCL2 sono stati riscontrati frequentemente nel cancro alla prostata, e correlano in particolare con il fenotipo metastatico ormone-indipendente (Krajewska *et al.*, 1996).

Introduzione

È stato recentemente riportato come l'over-espressione di BCL2 è mediata dalla regolazione trascrizionale da parte del fattore NF- κ B in linee cellulari LNCaP (cellule di cancro prostatico metastatico ai linfonodi, androgeno-dipendenti) a seguito di trattamento con TNF- α (Catz e Johnson, 2001). La proteina p53, invece, regola l'espressione di una serie di geni correlati all'apoptosi che partecipano sia alla via intrinseca (BCL2, BCL-xL, etc.) sia alla via estrinseca (Fas, TRAIL, etc.) (Guseva *et al.*, 2004), concetto evidenziato in figura 1.6. Oltre a intervenire nell'apoptosi mediata dai recettori Fas e TNF, p53 pare essere coinvolto nella regolazione negativa dell'espressione del PSA (Gurova *et al.*, 2002).

Diversi studi riportano come il fattore trascrizionale pro-infiammatorio NF- κ B sia costitutivamente attivato in linee cellulari di cancro prostatico androgeno-indipendenti PC3 e DU145 (Gasparian *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2002) ma non in linee LNCaP, androgeno-dipendenti. Questa attivazione sarebbe un importante supporto per il mantenimento dello status androgeno-indipendente. È noto che i recettori per gli androgeni e il fattore NF- κ B competono in modo mutualmente esclusivo per il legame a medesimi co-attivatori. Si presume che quando l'NF- κ B è costitutivamente attivato vi sia una regolazione negativa nella funzione del recettore androgenico (Guseva *et al.*, 2004). L'attivazione della via PTEN/PI3K/AKT è un evento comune nel cancro prostatico umano avanzato (Dong *et al.*, 1998; Bookstein, 2001) come conseguenza sia di delezioni omozigotiche che di mutazioni (Wag *et al.*, 1998; Liotta e Kohn, 2004). Il gene soppressore dei tumori PTEN (Phosphatase/Tensin homolog) codifica per una fosfatasi responsabile della defosforilazione ed inattivazione del fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3), un secondo messaggero prodotto a seguito di attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) in risposta al legame di specifici ligandi a recettori dei fattori di crescita (Cantley e Neel, 1999). Il PIP3 attiva la PDK1

(Phosphoinositide-dependent Kinase 1) la quale fosforila e rende operante la chinasi AKT, che incrementa la sopravvivenza cellulare attraverso la fosforilazione ed inattivazione di molecole target pro-apoptotiche, come BAD e la caspasi-9 (Cairns *et al.*, 1997).

Quando le cellule dell'epitelio prostatico si distaccano dalla matrice sottostante, muoiono attraverso un processo denominato anoikis (dal greco "senza fissa dimora"). Al contrario, le cellule cancerose riescono a sopravvivere anche se isolate grazie all'innescamento di meccanismi paracrini o autocrini che sopprimono l'anoikis e stimolano l'invasione tissutale (Douma *et al.*, 2004). Questo fenomeno consente alle cellule trasformate di sopravvivere anche senza contatto con altre cellule o il substrato e di diffondere tramite un processo di invasione. I meccanismi autostimolatori includerebbero la produzione della proteina TrkB responsabile dell'attivazione di PI3K. Il risultato è la stimolazione dell'AKT con il conseguente blocco dell'attività caspasi in grado di mediare non solo l'apoptosi ma anche forme di morte cellulare ad essa correlata come l'anoikis (Speliotes *et al.*, 2000). Pertanto, attraverso tali processi, le cellule continuano a sopravvivere dopo il distacco dalla matrice, raggiungono una nuova sede e metastatizzano.

Un altro gruppo di molecole in grado di svolgere un ruolo importante nel meccanismo di sviluppo della resistenza all'apoptosi del carcinoma prostatico sono le IAP (Inhibiting-Apoptosis Protein), ed in particolare la survivina, proteina coinvolta nella regolazione del passaggio G2-M del ciclo cellulare (Uren *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998).

La produzione della proteina survivina è generalmente regolata con una modalità dipendente dal ciclo cellulare (Kobayashi *et al.*, 1999; Xing *et al.*, 2001). Per tale motivo l'mRNA di survivina non è rilevabile in tessuti adulti normali, mentre è fortemente espresso in cellule neuroendocrine tumorali prostatiche benigne e maligne (Ambrosini *et al.*, 1997), in linee cellulari prostatiche cancerose (McEleny *et al.*,

Introduzione

2002; Dveraux e Reed, 1999) e in vari altri tipi di tumori. Evidenze sperimentali suggeriscono come la survivina agisca attraverso l'inibizione diretta delle caspasi effettrici terminali 3 e 7 (Russel e Nurse, 1986).

Anche difetti nelle vie di morte cellulare non apoptotica sono connessi all'induzione della trasformazione cellulare ed alla progressione tumorale (Okada e Mak, 2004).

Contribuiscono alla tumorigenesi la degradazione non controllata di proteine attraverso la via del proteasoma, l'autofagia e mutazioni o difetti nel controllo dell'espressione di geni richiesti per la catastrofe mitotica.

La catastrofe mitotica è un tipo di morte cellulare causato da una mitosi aberrante. Si associa alla formazione di cellule giganti multinucleate contenenti cromosomi non condensati, morfologicamente distinguibili da cellule in apoptosi e necrosi (Li *et al.*, 1999). Evidenze sperimentali dimostrano come un importante ruolo citoprotettivo è svolto proprio dalla survivina; essa si assocerebbe ai microtubuli ed ai centromeri (Li *et al.*, 1998), garantendo l'integrità del fuso mitotico in modo da promuovere la progressione della mitosi. La carenza o l'inattivazione di survivina indurrebbe l'arresto del ciclo cellulare e morte attraverso catastrofe mitotica, evento osservato anche nella linea cellulare prostatica cancerosa PC3 (Shaffer e Scher, 2003).

Malgrado queste evidenze nel caso del CaP, a differenza di altre neoplasie, non sono state ancora definite le fasi e i geni coinvolti nella progressione verso la malignità.

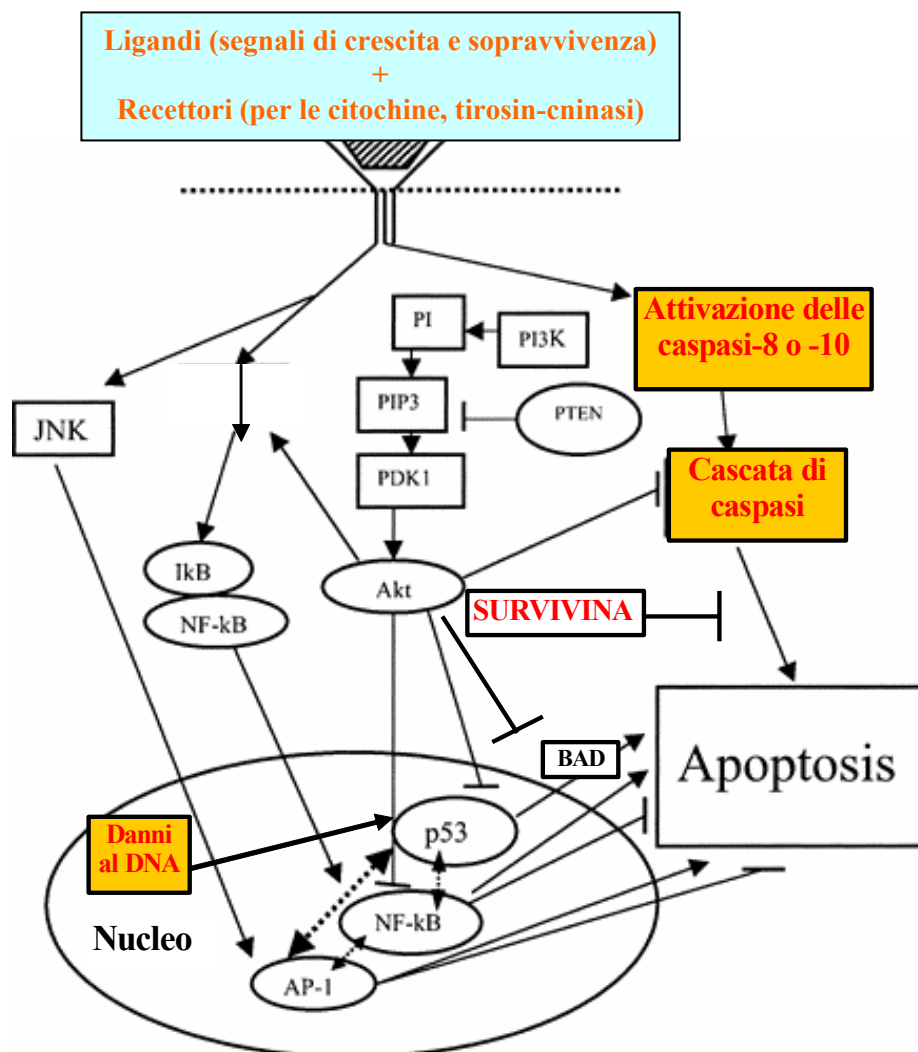


Figura 1.5: Molecole e vie correlate con l'insorgenza e la progressione del tumore prostatico.

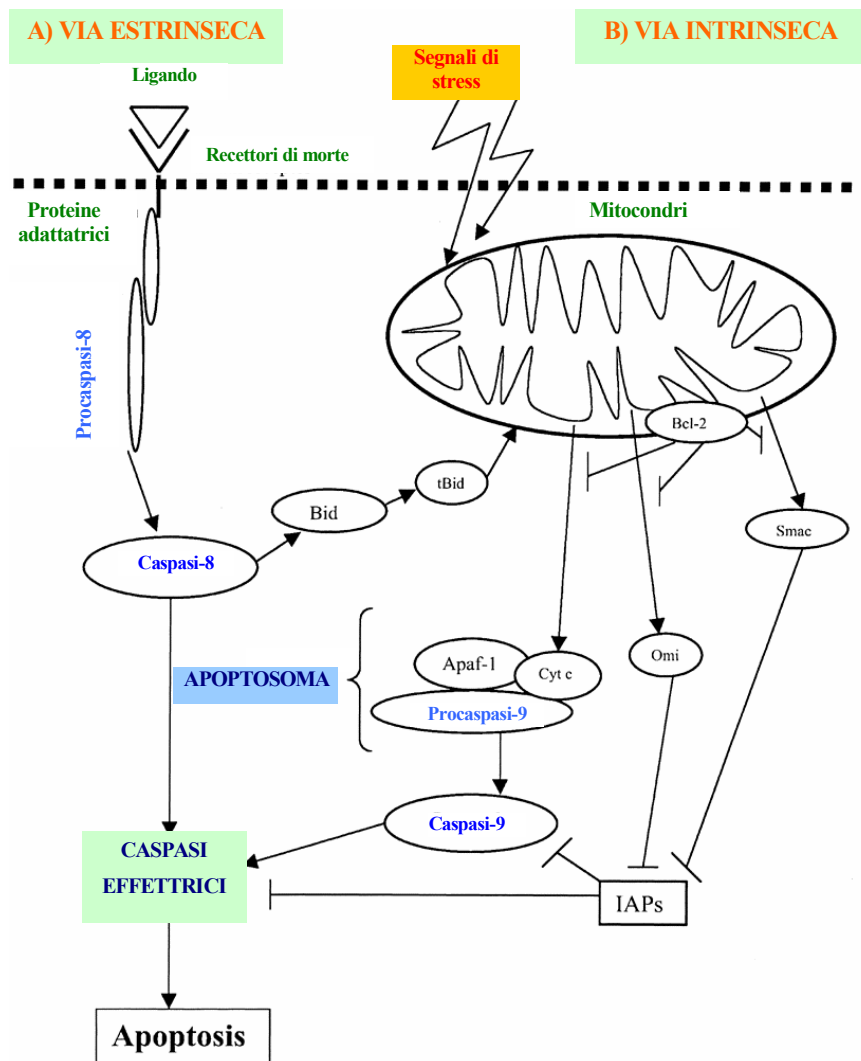


Figura 1.6. Apoptosi: vie di attivazione delle caspasi. (A) Pathway estrinseco, attivato dal legame di un ligando di morte ad uno specifico recettore; la caspasi-8 può clivare Bid. La forma troncata della molecola (tBid) trasloca nel mitocondrio dove può dare inizio alla via di attivazione intrinseca della caspasi. **(B)** Pathway intrinseco, attivato da diversi segnali di stress. Dal mitocondrio fuoriescono varie molecole responsabili dell'attivazione della caspasi-9. Bcl-2 previene il rilascio dei fattori mitocondriali. (Modificato da Guseva *et al.*, 1998.)

1.2 LA CLUSTERINA (CLU)

1.2.1 Cenni storici

Fin dalla sua scoperta la Clusterina (CLU) ha impegnato diversi gruppi di ricerca in tutto il mondo, occupati tuttora nel tentativo di svelarne la precisa funzione biologica nell'uomo, e nei mammiferi in generale. Ad oggi e dopo quasi 20 anni di studio, nonostante il consenso generale sul fatto che essa svolga un ruolo importante in quasi tutti i processi fisiologici fondamentali dell'organismo umano e nello sviluppo di diverse malattie come il cancro e l'Alzheimer, dopo quasi 20 anni di studio, CLU è ancora considerata una proteina "enigmatica". Questa definizione deriva dal fatto che, nonostante l'elevata produzione scientifica ad essa dedicata, esiste ancora una sostanziale carenza di informazioni basilari sui meccanismi che regolano la complessa espressione di CLU.

La Clusterina è stata isolata per la prima volta nel 1983 da Fritz *et al.* a partire dal liquido seminale di montone. Questo fluido era noto per la sua capacità di indurre l'aggregazione *in vitro* sia di cellule del Sertoli sia di eritrociti provenienti da diverse specie. Nel loro lavoro pionieristico gli autori mostrarono come una proteina termostabile e sensibile alla tripsina fosse responsabile di questo fenomeno. Dato l'importante ruolo che sembrava rivestire nell'interazione cellula-cellula, questa proteina extracellulare fu denominata "Clusterin" (CLU). In seguito, CLU fu purificata dallo stesso modello sperimentale (Blaschuk *et al.*, 1983) ed identificata come una glicoproteina con una massa molecolare di circa 80 kDa ed un punto isoelettrico di 3.6. Gli autori notarono inoltre che, in condizioni riducenti, CLU si dissociava in subunità di circa 40 kDa, mentre, a pH neutro e a bassa concentrazione salina, la proteina si presentava in forma dimerica e tetrameric. Nello stesso lavoro, oltre alla composizione

Introduzione

amminoacidica di CLU, è stata riportata la presenza di glucosammina (4.5%) nella forma extracellulare della proteina. Un anno dopo gli stessi autori isolarono forme di CLU con differenti punti isoelettrici dal mezzo di crescita di culture primarie di cellule del Sertoli di ratto, proponendo quindi questo tipo cellulare come potenziale fonte di Clusterina (Blaschuk e Fritz, 1984).

La prima immunolocalizzazione di CLU risale al 1985, quando Tung e Fritz svilupparono il primo anticorpo monoclonale contro Clusterina per studiarne la distribuzione nell'apparato riproduttivo di montone adulto (Tung e Fritz, 1985).

Sin dai primi studi pubblicati, è emerso come il gene di CLU fosse espresso in un'ampia gamma di tessuti di specie animali, anche se a livelli notevolmente differenti (Choi *et al.*, 1989; de Silva *et al.*, 1990; Fischer-Colbrie *et al.*, 1984; James *et al.*, 1991). Infatti, in modo pressoché contemporaneo, specie omologhe di CLU sono state isolate e/o clonate da diversi laboratori coinvolti in differenti aree di ricerca, causando la creazione di un discreto numero di sinonimi della stessa molecola, come illustrato in tabella 1.1 (Rosenberg e Silkensen, 1995). Nel 1986 il cDNA di CLU fu inizialmente identificato da Montpetit *et al.* nella prostata di ratto sottoposta a castrazione chimica e denominato "Testosterone Repressed Prostate Message 2" (TRPM2). A quell'epoca TRPM2 fu descritto come un cDNA troncato. Ma in un lavoro successivo ed indipendente del 1989, mediante clonaggio, sequenziamento e confronto in banca dati del cDNA completo, Bettuzzi e collaboratori dimostrarono come TRPM2 fosse completamente omologo al cDNA di Sulfated Glycoprotein 2 (SGP2); una delle più importanti glicoproteine prodotte dalle cellule del Sertoli di ratto (Bettuzzi *et al.*, 1989; Collard e Grisword, 1987). L'anno precedente Cheng *et al.* avevano scoperto che SGP2 era identica alla Clusterina, la proteina serica descritta in precedenza da Fritz *et al.* nel 1983 (Cheng *et al.*, 1988). Nell'uomo CLU fu descritta per la prima

volta nel 1989 da Jenne e Tshopp come una componente del complemento nel siero umano e denominata CLI (Complement Cytolysis Inhibitor). Infine, nel 1990, anche la apolipoproteina denominata ApoJ, che si associava ad una sottoclasse di lipoproteine ad alta densità, legandosi ad esse attraverso eliche antipatiche presenti nella propria struttura, fu identificata come la proteina umana omologa a SGP2 (de Silva *et al.*, 1990) e di conseguenza a CLU.

Tabella 1.1 Elenco delle diverse forme di Clusterina isolate e/o clonate da tessuti di differenti specie, associate alla funzione biologica (modificato da Rosenberg *et al.*, 1995).

TESSUTO	SPECIE	NOME	ASSOCIATA A	REFERENZA
Fluido della Rete testis	Montone	<i>Clusterina</i>	Riproduzione	Blaschuk <i>et al.</i> (1983)
Medulla	Bovino	<i>GPIII</i>	Granuli cromaffini	Fischer-Colbrie <i>et al.</i> (1984)
Prostata	Ratto	<i>TRPM-2</i>	Apoptosi	Leger <i>et al.</i> (1987)
Prostata	Ratto	<i>SGP-2</i>	Riproduzione	Bettuzzi <i>et al.</i> (1989)
Cellule neuroretinali	Quaglia	<i>T64</i>	Trasformazione cellulare	Michel <i>et al.</i> (1989)
Siero (fegato)	Uomo	<i>SP-40,40</i>	Regolazione del Complemento	Kirszbaum <i>et al.</i> (1989)
Siero (fegato)	Uomo	<i>CLI</i>	Regolazione del Complemento	Jenne and Tschopp (1989)
Sangue	Uomo	<i>ApoJ</i>	Trasporto lipidi	deSilva <i>et al.</i> (1990)
Sangue	Uomo	<i>NAI/NA2</i>	Trasporto lipidi	James <i>et al.</i> (1991)
Retina	Uomo	<i>K611</i>	Retinite pigmentosa	Jones <i>et al.</i> (1992)

La prima review, pubblicata nel 1992, descrive la Clusterina come una proteina implicata in numerosi e differenti fenomeni biologici come l'aggregazione degli eritrociti, l'attività del complemento, il trasporto nel sangue di lipidi e peptidi biologicamente attivi, la maturazione del liquido seminale, il rimodellamento tissutale e la difesa immunitaria (Jenne and Tschopp, 1992).

Introduzione

Attualmente, in accordo con le recenti raccomandazioni riguardanti l'unificazione della terminologia, è stato adottato come nome ufficiale Clusterina e come abbreviazione CLU.

1.2.2 Gene e promotore

Il gene codificante la Clusterina è presente in singola copia nel genoma umano e mappa nella regione centrale del braccio corto del cromosoma 8 (Purello *et al.*, 1991; Slawin *et al.*, 1990; Tobe *et al.*, 1991), in prossimità del locus genico di LPL (Lipoprotein Lipase) (Fink *et al.*, 1993) e più precisamente in una posizione di transizione tra la banda 8p12 e 8p21 (Dietzsch *et al.*, 1992), zona frequentemente deleta in vari tumori, incluso quello prostatico.

Il gene di CLU è ben conservato durante l'evoluzione e la sua struttura genomica è stata caratterizzata in quaglia, ratto, topo e uomo (Herault *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1993); nei mammiferi, i geni mostrano caratteristiche comuni. Ognuno si compone di nove esoni intervallati da otto introni, entrambi di lunghezza variabile, a coprire una estensione approssimativa 17 kb nell'uomo (Wong *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1994). In topo ed in ratto i geni mappano rispettivamente sul cromosoma 14 e 15, coprendo una regione di circa 14 e 39 kb; inoltre, sia l'esone 1 che il 9 non sono tradotti nel topo (Birkenmeier *et al.*, 1993; Goldner-Sauvé *et al.*, 1991).

L'allineamento di sequenza delle regioni fiancheggianti il 5' del gene di uomo, topo e ratto ha rivelato che l'omologia fra le putative regioni regolatrici è confinata ad un dominio prossimale appena a monte del sito di inizio trascrizione (figura 1.7; Michel *et al.*, 1997). Questo promotore minimale altamente conservato presenta tipiche sequenze TATAA (TATA box, -26) e GCATT (CAAT box, -93) localizzati a monte del sito d'inizio trascrizione, nonché diversi e potenziali elementi regolatori, inclusi i motivi AP-1, AP-2, Sp1 e NF1 (nella regione da -73 a -87) in grado di guidare la complessa espressione tessuto-

specifica del gene (Wong *et al.*, 1994; Michel *et al.*, 1997). È stato dimostrato inoltre che il sito conservato AP-1 è funzionale e risponde a TGF- β (Trasforming Growth Factor- β), all'NGF (Nerve Growth Factor) e all'EGF (Epidermal Growth Factor) in linee cellulari CCl64 e PC12 (Jin e Howe, 1997; Gutacker *et al.*, 1999). Sempre nel 1997 Michel *et al.* hanno individuato nella linea cellulare umana A431 un dominio di 14 bp, che risultava altamente conservato in tutte le specie di vertebrati analizzate, e l'hanno denominato "Clusterin Element" (CLE). La sequenza di CLE appare strettamente correlata a quella consenso riconosciuta dagli elementi di risposta allo shock termico (HSE), dalla quale differisce solo per una base. Il singolo mismatch nel motivo centrale nGAAn non appare significativo, infatti CLE è riconosciuto dall' HSF1 (Heat Shock transcription Factor 1) e sembra sia in grado di mediare la trascrizione indotta da shock termico (Jones e Jomary, 2002). È stato inoltre proposto come tale sequenza possa agire in sinergia con l'elemento AP-1, rendendo il promotore del gene particolarmente sensibile a cambiamenti ambientali. Nel primo introne del gene di ratto, oltre agli Elementi di Risposta ai Glucocorticoidi (GRE), sono presenti i siti riconosciuti dai fattori di trascrizione AP-2, Sp-1 ed NF- κ B; mentre all'estremità 5' del primo esone sono stati individuati elementi di risposta all'AMP-ciclico (Roseblit e Chen, 1994). Il gene di quaglia non contiene il motivo TATA box e la sua espressione è regolata attraverso un sito AP-1 ed un'isola ricca in purine non presente nel promotore del gene umano né in quello di ratto (Michel *et al.*, 1995). Immediatamente a monte della regione conservata del promotore, sia in ratto che nell'uomo, sono state identificate anche una mini isola HTF-simile ed una sequenza ricca in G+C, compresa fra la TATA box ed il sito +1, contenente diversi dinucleotidi CpG (Wong *et al.*, 1993). Entrambe queste zone appaiono suscettibili alla metilazione, suggerendo una

Introduzione

possibile regolazione dell' espressione di CLU per via epigenetica sia in situazioni fisiologiche che patologiche.

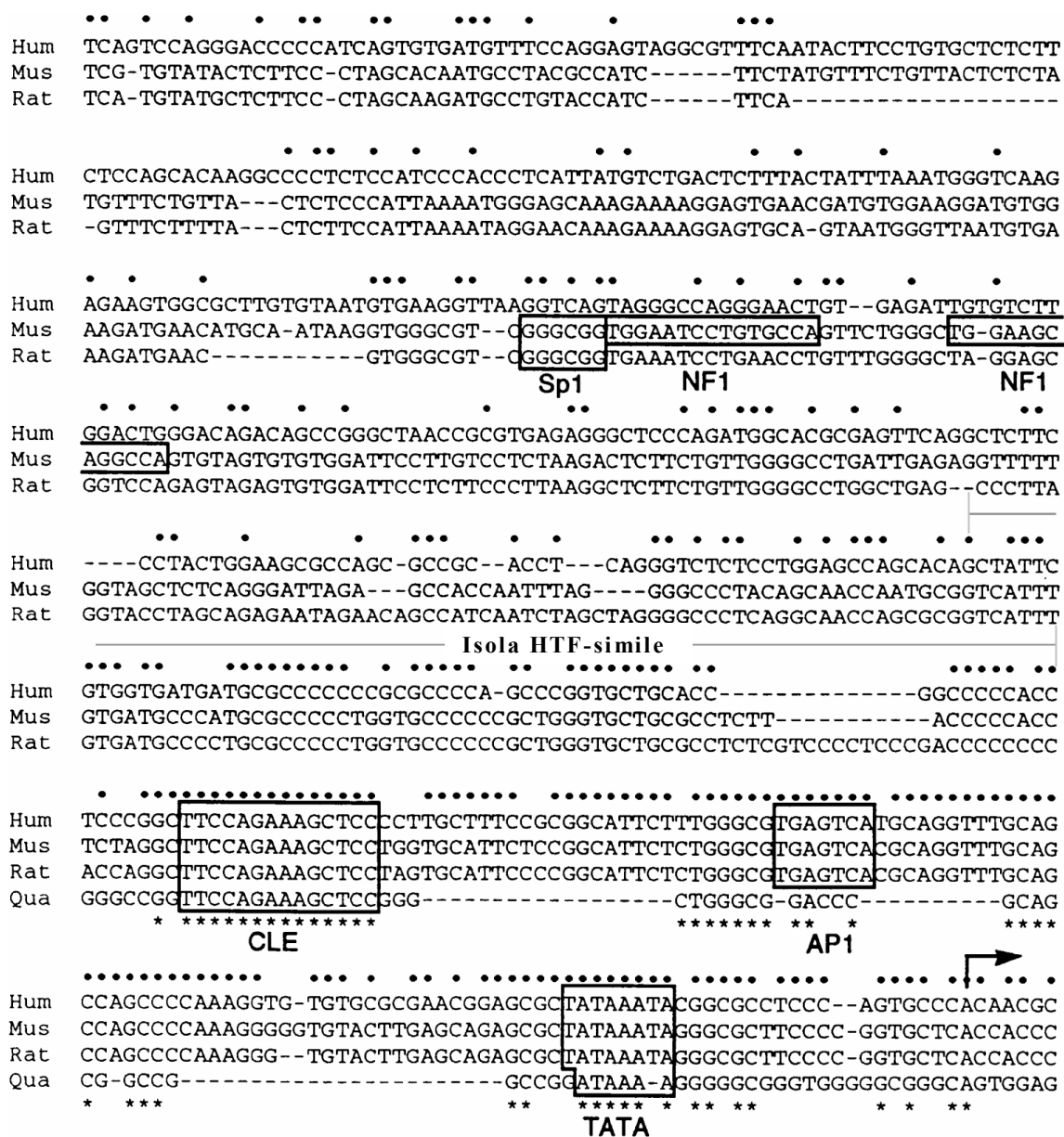


Figura 1.7: Cis-elementi conservati nel promotore del gene CLU.
 L'allineamento delle sequenze di promotori del gene della CLU di mammiferi (Hum= uomo, Rat= ratto e Mus= topo) mostra poche regioni di omologia, però evolutivamente conservate. L'elemento CLE appare altamente conservato, mentre la comparazione con il contesto circostante mostra notevoli divergenze tra mammiferi e uccelli (Qua= quaglia, nel caso specifico). Le sequenze conservate tra i mammiferi sono indicate con i punti neri, mentre quelle conservate anche negli uccelli con un asterisco; l'isola HTF-simile è sottolineata (modificato da Michel et al., 1997).

1.2.3 Varianti trascrizionali

Fino al 2006 si riteneva che la trascrizione del gene *CLU* desse origine ad un unico trascritto di 1.9 Kb contenente due AUG in-frame, uno nell'esone 2 e l'altro nell'esone 3 (human clusterin coding sequence, GenBank accession no. M64722). Un recente aggiornamento della banca dati di sequenze di riferimento GenBank ha evidenziato invece che, nei primati, esistono due varianti trascrizionali di *CLU*, denominate "Isoforma 1" ed "Isoforma 2", identificate rispettivamente dai codici di accesso NM_001831 ed NM_203339. Questi due trascritti possiedono un esone 1 unico e condividono la restante sequenza nucleotidica dall'esone 2 al 9 ed una regione terminale non tradotta (3'UTR). Le due isoforme risultano ancora scarsamente studiate, anche se ne è stata verificata la coesistenza mediante Real Time PCR e l'espressione differenziale in cellule tumorali di prostata ed in cellule epiteliali trasformate e normali di colon (Cochrane *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2007). Inoltre, consultando il database ASAP (Alternative Splicing Annotation Project; Lee *et al.*, 2003) per il cluster Unigene di *CLU* (Hs.75106), un terzo trascritto denominato "Isoforma 11036" si presenta fra le più probabile varianti trascrizionali del gene. I tre pre-mRNA contengono 9 esoni, 8 introni e una regione terminale non tradotta (3'-UTR). Tutte e tre le varianti trascrizionali possiedono un esone 1 unico e condividono la restante sequenza nucleotidica dall'esone 2 al 9 (figura 1.8)

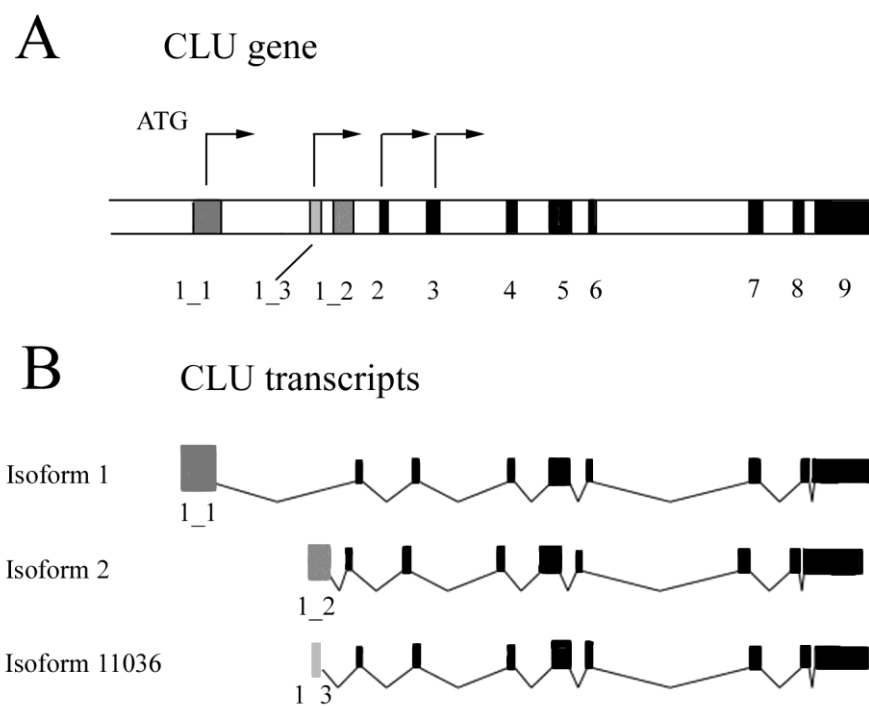


Figura 1.8: Gene e varianti trascrizionali di CLU

(A) Rappresentazione schematica dell'organizzazione genica di CLU sul cromosoma 8. I blocchi neri fanno riferimento agli esoni dal 2 al 9, comuni ai tre trascritti, mentre i blocchi grigi riproducono l'esone 1 unico delle diverse varianti trascrizionali di CLU. L'esone 1 dell'Isoforma 1 (1_1) è indicato in grigio scuro, l'esone 1 dell'Isoforma 2 (1_2) è indicato in grigio mentre quello dell'Isoforma 11036 (1_3) in grigio chiaro. **(B)** Rappresentazione schematica dei diversi messaggeri di CLU (tratto da Rizzi *et al.*, 2009)

- **Isoforma 1 (CLU1)**

L'Isoforma 1 corrisponde alla sequenza conosciuta in precedenza come M64722 ma estesa alla sua estremità 5'. È interessante notare che il completo sequenziamento dell'esone 1, inizialmente riportato in forma troncata, ha rivelato la presenza di un sito di inizio trascrizione potenzialmente funzionale (figura 1.9). Per questo mRNA, è predetta la produzione di una proteina di 57.8 kDa, composta da 501 amminoacidi e con una localizzazione prevalentemente citoplasmatica/nucleare (PSORT; Nakai e Horton,

2007). Perciò l'Isoforma 1 potrebbe spiegare l'esistenza di forme intracellulari di CLU in grado di sfuggire al pathway secretorio.



Figura 1.9: Sequenza amminoacidica predetta per l'Isoforma 1 di CLU

La traduzione dell'Isoforma 1 a partire dalla ORF più grande, e quindi dall'AUG presente nell'esone 1, porterebbe alla produzione di una putativa proteina con una porzione N-terminale aggiuntiva di 52 aa indicata in rosso. In giallo è indicato la sequenza corrispondente al peptide leader. In verde ed in grassetto sono evidenziate le metionine derivate dai tre ATG funzionali presenti in frame nell'esoni 1, 2 e 3 della sequenza dell'Isoforma 1. Dato che la sequenza delle varianti trascrizionali di CLU è uguale a partire dall' esone 2, La seconda e la terza M sono comuni anche all'Isoforma 2 e all'Isoforma 11036. La forma completamente processata e secreta (sCLU) e la forma troncata a localizzazione nucleare (nCLU) di Clusterina sono tradotte, rispettivamente, a partire dal secondo e dal terzo AUG (modificato da Rizzi *et al.*, 2009).

- **Isoforma 2 (CLU2)**

L'Isoforma 2 invece possiede un esone 1 alternativo non tradotto. Il primo sito di inizio traduzione disponibile è localizzato nell'esone 2 nella regione comune ai due trascritti ed immediatamente a monte della sequenza leader funzionale per

Introduzione

l'indirizzamento al reticolo endoplasmatico (RE). Partendo dalla Open Reading Frame (ORF) più ampia, ovvero dall'AUG presente nell'esone 2, per questo messaggero è predetta la produzione di una proteina di 449 aa destinata alla secrezione (figura 1.9). Una predizione simile era stata ottenuta per la precedente sequenza M64722. CLU2 tuttavia possiede alcune caratteristiche inusuali come una lunga regione 5'UTR di 276 nucleotidi, corrispondente all'esone 1 unico non tradotto, il quale possiede una struttura secondaria complessa. Inoltre, all'interno di questa regione, è presente una piccola ORF di 57 nucleotidi, che potenzialmente potrebbe codificare per un putativo peptide regolativo. È noto che l'esistenza di regioni UTR altamente strutturate e con caratteristiche peculiari come un alta percentuale di GC, la presenza di ORF interne e di siti per il legame ai ribosomi, siano in grado di influenzare in modo significativo la traduzione degli mRNA. Questo tipo di regolazione, ad esempio, è stata studiata approfonditamente per la S-adenosilmetionina decarbossilasi (SAM-DC), un gene implicato nella regolazione del metabolismo delle poliammine. Infatti la delezione dell'intera 5'UTR, o anche solo la mutazione della sua ORF interna, comporta un notevole aumento della produzione della proteina corrispondente, dimostrando quindi la funzione inibitrice svolta da questa regione (Suzuki *et al.*, 1993; Nishimura *et al.*, 1999). Anche i prodotti proteici di altri geni come *SOCS-1* (Suppressor Of Cytokine Signaling 1; Schluter *et al.*, 2000), *RAR-β2* (Retinoic Acid Receptor-β2; Peng *et al.*, 2005) e *Bcl-2* (Harigai *et al.*, 1996) sono regolati a livello tradizionale e repressi in maniera specifica attraverso un meccanismo simile a quello ipotizzato per *SAM-DC*. Se questo tipo di regolazione fosse mai confermata anche per *CLU* si potrebbero ad esempio spiegare i bassissimi livelli di espressione generalmente associati all'Isoforma 2.

- **Isoforma 11036**

L'esone 1 unico dell'Isoforma 11036 è localizzato a livello genico fra gli esoni 1 dell'Isoforma 1 e 2. Nonostante questa sequenza non sia annotata come RefSeq in GenBank, essa si presenta come uno dei prodotti di splicing più probabili per il gene *CLU*. Anche questa isoforma, come la variante 1, possiede un AUG funzionale nel primo esone ed è predetta la produzione di una proteina di 460 aa con localizzazione prevalentemente nucleare .

Inoltre, tutti e tre i trascritti, differendo solo per l'esone 1, possiedono, oltre ad un AUG funzionale nell'esone 2, un altro sito di inizio traduzione in frame con gli altri nell'esone 3, che porterebbe alla produzione di una forma troncata di *CLU* con una predizione di localizzazione nucleare (n*CLU*, figura 1.9) (Scaltriti *et al.*, 2004a).

- **Messaggero alternativo descritto da Leskov**

Infine, nel 2003 Leskov *et al.* hanno individuato nella linea cellulare MCF7 un ulteriore messaggero, nel quale, in seguito ad un fenomeno di splicing alternativo, l'esone 1 dell'Isoforma 1 è direttamente legato all'esone 3. Questo trascritto è quindi privo dell'esone 2 e di conseguenza dell' AUG e della sequenza di indirizzamento al RE in esso contenuti. Al momento della scoperta di questo messaggero alternativo non erano disponibili le informazioni sulla presenza delle due isoforme di trascritto, e pertanto non era nota la presenza di un AUG funzionale nell'esone 1 dell'isoforma 1. Si era pertanto ritenuto che la perdita dell'esone 2 spostasse automaticamente l'inizio della traduzione sull'AUG in esone 3, producendo una proteina più corta, non indirizzata all'ER, ma localizzata nel citoplasma della cellula. Secondo gli autori,

questo trascritto alternativo sarebbe costitutivamente espresso in cellule MCF7 e codificherebbe per un precursore di una forma pro-apoptotica di CLU a localizzazione nucleare (pnCLU) (Leskov *et al.*, 2003). Fino ad oggi però nessun altro autore ha confermato l'esistenza di questa variante trascrizionale in altre linee cellulari e/o tessuti (Andersen *et al.*, 2007; Cochrane *et al.*, 2007; Schepeler *et al.*, 2007).

1.2.4 Forme proteiche

Ad oggi sono note almeno tre forme proteiche di CLU, strettamente collegate fra loro ma con funzioni e localizzazioni cellulari differenti. Attualmente però deve essere ancora compresa la correlazione esistente fra queste proteine e le varianti trascrizionali appena descritte.

- **Clusterina secreta (sCLU)**

La CLU secreta (sCLU) è la forma proteica meglio caratterizzata. La sCLU è una glicoproteina eterodimerica prodotta in un'ampia varietà di tessuti e presente nella maggior parte fluidi biologici, capace di interagire con un ampio spettro di molecole, oltre che con se stessa.

Sintesi e modificazioni post-traduzionali

La traduzione a partire dal codone AUG presente nell'esone 2 da parte dei ribosomi ancorati alla membrana del reticolo endoplasmatico ruvido, produce una pre-proteina di 449 aa, in cui i primi 22 rappresentano il peptide leader che consente l'ingresso della molecola nel lume del reticolo endoplasmatico (RE) (Wong *et al.*, 1994). Non appena affiora nel lume, il peptide segnale N-terminale viene rimosso da una specifica peptidasi

localizzata sul lato luminale della membrana del RE e rapidamente degradato. La catena polipeptidica risultante continua ad allungarsi ed emerge dal traslocone sporgendo nel lume del RE, fino al completamento della traduzione. La pro-CLU neosintetizzata (50 kDa) subisce a questo punto diverse modificazioni post-traduzionali. Il ripiegamento del polipeptide a livello della zona di giunzione tra la catena α e β è seguito dall'associazione tra le due subunità mediante la formazione di cinque ponti disolfuro tra residui di cisteina simmetricamente opposti della catena β (C¹⁰², C¹¹³, C¹²⁰ e C¹²⁸) e della catena α (C³¹³, C³⁰⁵, C³⁰², C²⁸⁶ e C²⁸⁵) (Jenne e Tschopp, 1989; Choi-Miura *et al.*, 1992). La proteina viene poi glicosilata tramite l'aggiunta e la successiva elaborazione di oligosaccaridi. Un precursore ubiquitario ad alto contenuto di mannosio viene trasferito ad opera dell'enzima oligosaccaride-proteina transferasi (OT) a residui specifici di asparagina della pro-CLU nascente, non appena tali aa emergono sul lato luminale dell'ER. L'analisi spettrale della massa ha permesso di identificare tre siti di glicosilazione nella subunità α (64N, 81N e 123N) ed altrettanti nella subunità β (64N, 127N e 147N). La pro-CLU neosintetizzata, già legata al precursore Glc₃Man₉(GlcNAc)₂, viene quindi deglicosilata dall'azione sequenziale delle Glucosidasi I e II (GI, GII) con formazione di un polipeptide monoglucosilato riconosciuto e legato da calnexina e calreticulina (CNX e CRT). Queste chaperones lectina-simili, interagendo selettivamente con oligosaccaridi monoglucosilati di proteine in fase di sintesi o neosintetizzate, impediscono il prematuro ripiegamento di segmenti amminoacidici adiacenti. L'eliminazione dell'ultimo residuo di glucosio da parte di GII ed il cambiamento conformazionale della pro-CLU, del complesso CNX/CRT o di entrambi, causa il rilascio della proteina dalle chaperones lectina-simili. La pro-CLU (56 kDa circa) può così essere esportata dal RE

Introduzione

e proseguire il viaggio verso l'apparato del Golgi (Parodi, 2000). Ulteriori modificazioni delle catene oligosaccaridiche legate ai residui di asparagina avvengono ad opera della mannosidasi II (mannII o MII) e della galattosio transferasi (GalT o GT), due proteine residenti rispettivamente nel compartimento cis- e medial- del Golgi (Roth e Berger, 1982; Moremen e Touster, 1985). Con la rimozione della maggior parte delle unità di mannosio, si ottiene la pro-CLU a basso tenore di mannosio la quale, può intraprendere due strade alternative:

- 1) "packaging" vescicolare, per la via di secrezione costitutiva;
- 2) l'aggiunta di una o più unità di fucosio ed il legame di residui di acido N-acetilneuramminico ad ogni residuo di galattosio, catalizzato da sialiltransferasi, per ottenere la pro-proteina da 76-80 kDa. Nel pathway di secrezione regolato, tale forma viene immagazzinata all'interno dei granuli secretori stoccati nel compartimento trans del Golgi sino al rilascio esocitico provocato da specifici segnali (Lakins *et al.*, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2003). La maturazione della molecola è completata nelle cisterne trans del Golgi, dove endopeptidasi residenti specifiche catalizzano il clivaggio della pro-CLU tra R227 e S228 (figura 1.11). 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 23-227), del peso di 34-36 kDa, ed α (residui 228-449), 36-39 kDa. La massa totale di carboidrati legati all'oloCLU sierica umana è compresa tra 8.4 e 13.4 kDa, equivalenti ad un 17-27% del peso totale. Lo stato di glicosilazione della CLU gioca un ruolo significativo nella sua attività biologica, influenzandone il targeting intra- o extra-cellulare in differenti condizioni fisiologiche (Kapron *et al.*, 1997).

Nella sequenza amminoacidica di CLU compaiono inoltre tre potenziali Segnali di Localizzazione Nucleare (NLS) riportati in figura 1.10:

1. SNLEEAKKKK, SV40 large T-antigen simile, localizzato all'estremità N-terminale tra i residui 74 e 81;
2. RREDLESLQVAERLTRK, tra i residui 324-340 e simile all'NLS bipartita ritrovata nella proteina nucleoplasmina di *Xenopus*;
3. RKKHR, localizzato al C-terminale tra gli aa 442-446.

```
MMKTL LL FVGL LL TWESGQVLGDQTVSDNELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGVKQIKTLIEKTNEERK
TLLSN LEEAKKKK EDALNETRESETKLKE L PGVCNETMMALWEECKPCLKQTCMKFYARVCRSGSGLV
GRQLEEF LNQSSPFYFWMNGDRIDSLLENDRQQTHMLDVMQDHF SRASSI IDELFQDRFFTTREPQDTY
HYLPFSLPHRRPHFFFPKSRIVRSLMPFSPYEPLNFHAMFQPFLEMIHEAQQAMD IHFHS PAFQHPPT
EFIREGDDDR TVCREIRHNSTGCLRMKDQCDKCREILSVCSTNNPSQAKL RREDLESLQVAERLTRK
YNELLKSYQWKMLNTSSLLEQLNEQFNWVSRLANLTQGEDQYYLRVTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVK
LFDSDPITVTVPVEVSRKNPKFMETVAEKALQEY RKKHR EE
```

Figura 1.10: Sequenza amminoacidica della clusterina umana (GenBank accession no. M64722). La catena β ed α sono colorate rispettivamente in rosso e blu; mentre i tre potenziali segnali di localizzazione nucleare sono evidenziati in verde (modificato da Scaltriti *et al.*, 2004).

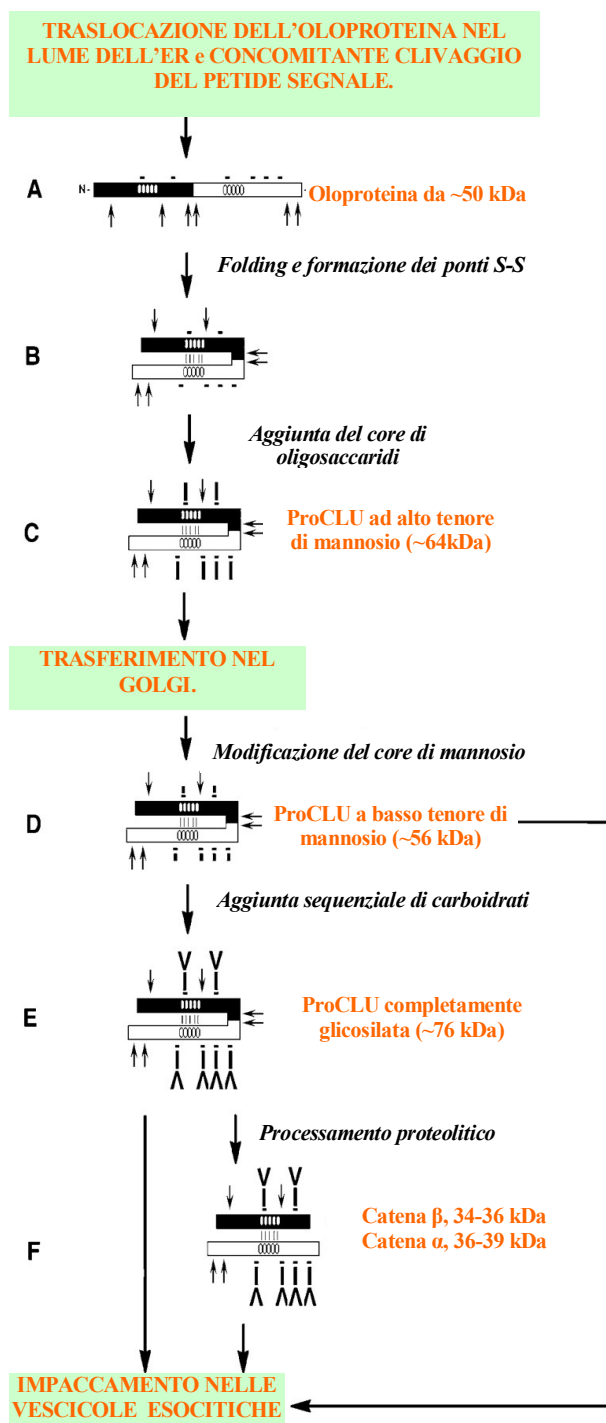


Figura 1.11: Modello di biogenesi della sCLU umana. Dopo la traduzione, la rimozione del peptide segnale e la formazione dei ponti S-S (**A**), il precursore subisce una prima glicosilazione parziale nel lume dell'ER (**B**) che porta alla formazione della proCLU (**C**). La glicosilazione completa, accompagnata dal taglio proteolitico nel trans-Golgi (**D**, **E**) permette l'ottenimento della CLU matura del peso di 75-80 kDa (**F**). Sono indicate le cisteine coinvolte nella formazione dei ponti disolfuro, alcuni siti di taglio proteolitico (frecche) ed il sito di clivaggio (R²²⁷-R²²⁸).

Predizione di struttura secondaria e terziaria

L'analisi computazionale per la predizione della struttura secondaria eseguita sulle sequenze amminoacidiche della sCLU di ratto, bovino e uomo, mostra come la molecola contenga α -eliche anfipatiche in una percentuale variabile dal 26 al 49% (Bailey *et al.*, 2001). L'utilizzo del programma Amphipath ha consentito di visualizzare le regioni di CLU in grado di formare α -eliche anfipatiche. Delle α -eliche predette, cinque appaiono altamente conservate per presenza e posizione nelle varie specie di mammifero (ratto, bovino e uomo) (figura 1.14). La lunghezza di tali elementi di struttura secondaria è variabile da specie a specie (tra i 16 ed i 20 aa), così come la successione degli amminoacidi, mentre il pattern di residui idrofilici e idrofobici appare conservato. Le α -eliche anfipatiche della CLU mediano interazioni idrofobiche con numerosi ligandi, a loro volta idrofobici, ed interazioni elettrostatiche attraverso i gruppi polari con ligandi idrofilici; ciò permette un'affinità di legame non specifica relativamente alta. La capacità di sCLU di legare un'ampia varietà di molecole *in vitro* suggerisce l'esistenza di uno o più siti di legame dinamici e probabilmente privi di una rigida struttura terziaria. Attraverso l'applicazione di un algoritmo di predizione del disordine chiamato PONDR (Predictor Of Natural Protein Disorder; Romero *et al.*, 2001) è stata evidenziata la presenza di più regioni con queste caratteristiche, localizzate all'estremità N- e C-terminale delle subunità α e β , e che appaiono maggiormente conservate nelle molecole di ratto, bovino e uomo. In particolare in ratto sono presenti tre regioni di questo tipo: una della lunghezza di oltre 60 aa all'estremità C-terminale della catena α e due all'estremità N-terminale della subunità β , costituite da 20 e 30 residui rispettivamente, e separate da una sequenza di circa 20 aa.

La sCLU di ogni specie di mammifero esaminata contiene inoltre:

Introduzione

- regioni predette come strutturalmente organizzate, intorno ai cinque residui di cisteina, coinvolti nella formazione dei ponti di disolfuro (residui 102-129 nella catena α e 285-313 nella catena β);
- una breve sequenza priva di ordine coincidente con il sito di clivaggio post-traduzionale (residui 227-228);
- una regione di 20-25 aa predetta come priva di organizzazione strutturale, localizzata fra i residui amminoacidici 320 e 345 (Wilson e Easterbrook-Smith, 2000; Bailey *et al.*, 2001).

La titolazione in agente denaturante del complesso Clusterina-ANS (acido 1-anilino-8-naftalensulfonico, fluoroforo in grado di interagire solo con sequenze *molten globule*), ha permesso di chiarire come la regione di legame della proteina riconosciuta dall'ANS, e quindi una delle regioni predette come potenzialmente priva di ordine, è assimilabile ad un *molten globule*. L'esistenza di siti di taglio proteolitico in regioni predette non solo di disordine ma anche di ordine strutturale indica la presenza di zone di flessibilità locale le quali potrebbero facilitare modificazioni conformazionali in grado di incrementare la capacità della proteina di legare un'ampia gamma di molecole (figura 1.12).

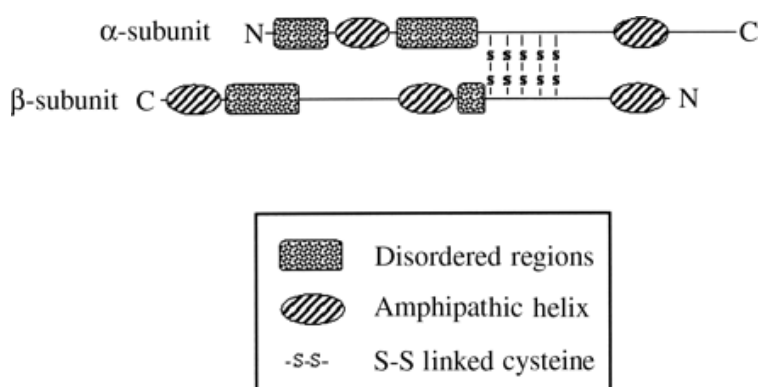


Figura 1.12: Rappresentazione schematica della localizzazione delle regioni strutturate e di disordine presenti nella Clusterina secreta umana (tratto da Rizzi *et al.*, 2010).

L'analisi della composizione amminoacidica ha permesso di ottenere informazioni aggiuntive. Le regioni predette come strutturalmente disorganizzate mostrano un atipico arricchimento di valina (V) e leucina (L), residui comuni nelle strutture superavvolte (*coiled-coil*) e nelle cerniere di leucina (*leucine-zipper*). Inoltre si riscontra anche un arricchimento in prolina (P) ed una marcata deplezione di glicina (G). Siccome sia P che G sono dei potenti "ripiegatori di eliche", ossia amminoacidi localizzati nelle anse di collegamento tra due strutture ad α -elica in successione, tale composizione supporta la possibile formazione di fasci di α -eliche in strutture *coiled-coil* nelle regioni della CLU predette come prive di struttura secondaria specifica (residui 40-99 nella catena β e 318-350 nella catena α ; Wilson e Easterbrook-Smith, 2000). Attraverso gli algoritmi COIL (Lupas, 1991), è stato possibile identificare che una delle cinque α -eliche predette con il programma Amphiprot si localizza all'interno della regione di disordine strutturale posta al C-terminale della subunità α , mentre un'altra α -elica si trova tra le due sequenze prive di reale struttura secondaria all'N-terminale della subunità β (figura 1.13).

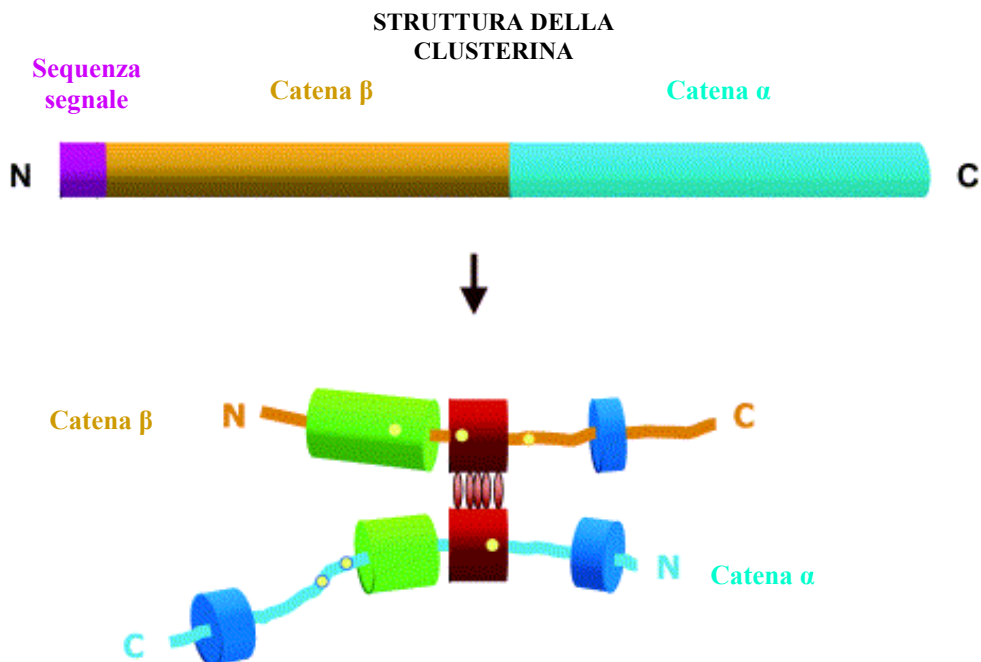


Figura 1.13: Rappresentazione schematica della struttura della Clusterina secreta umana. Il polipeptide precursore viene clivato a livello degli amminoacidi 22-23 per la rimozione del peptide segnale (magenta) e a livello degli amminoacidi 227-228 generando la catena α (arancione) e la catena β (azzurra) unite insieme in senso antiparallelo da cinque ponti disolfuro (ellissi rosse). Lo studio di modelling prevede due domini coinvolti nella formazione di strutture "coiled-coil" (in verde) e tre domini ad α -elica anfipatici (in blu). I sei potenziali siti di glicosilazione sono indicati come punti gialli (modificata da Jones e Jomary, 2002).

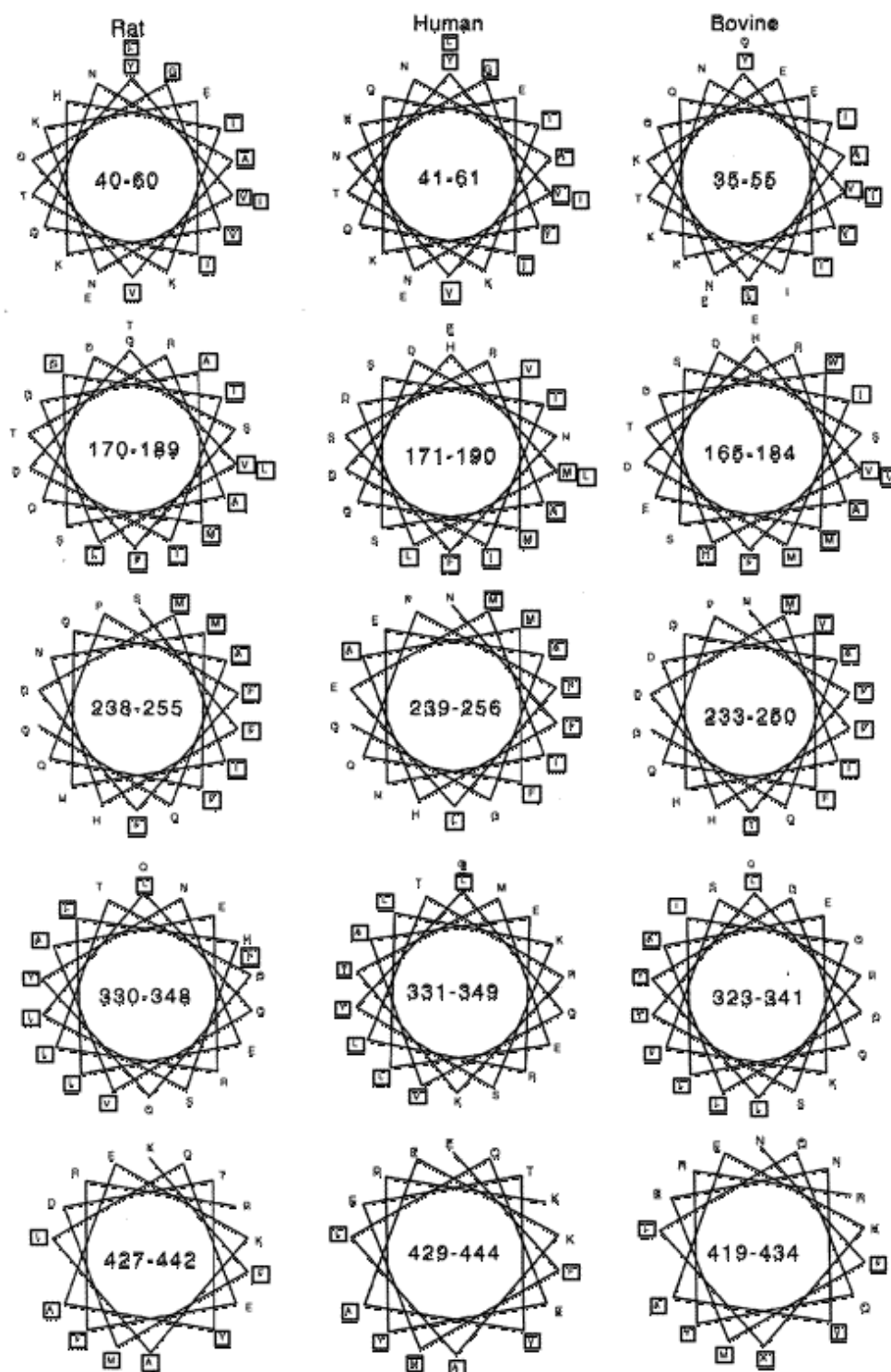


Figura 1.14: Predizione di α -eliche amfipatiche. L'illustrazione mostra i diagrammi a spirale di cinque α -eliche amfipatiche conservate nella Clusterina di ratto, uomo e bovino. Le facce idrofiliche delle eliche sono rappresentate da aa carichi e/o polari racchiusi nel quadrato, al contrario degli aa non polari, che formano le facce idrofobiche (tratto da Bailey *et al.*, 2001).

L'attività di chaperone molecolare *in vitro*

È stato recentemente dimostrato come sCLU, a concentrazioni fisiologiche, agisca da chaperone molecolare in grado di inibire *in vitro* la precipitazione di proteine indotta da stress termici e/o riduzione da agenti denaturanti (Poon *et al.*, 2002a). La sCLU si comporterebbe da small Heat Shock Protein (sHSP) non partecipando alla rinaturazione diretta delle proteine ma, legandosi ad esse, creando una sorta di serbatoio refolding-competente dal quale attingerebbero chaperones ATP-dipendenti (come HSP70) per promuovere la corretta rinaturazione delle proteine coinvolte (Poon *et al.*, 2000).

sCLU è in grado di interagire con un'ampia varietà di molecole che include lipidi (de Silva *et al.*, 1990), proteine amiloidi (Boggs *et al.*, 1996), componenti del complesso di attacco alla membrana (Jenne and Tschopp, 1989; Kirszbaum *et al.*, 1989) e chemioterapici come il Taxolo. In quest'ultimo caso il sequestro di Taxolo da parte di sCLU può spiegare perché tumori sovra-esprimenti CLU sono Taxolo-resistenti (Park *et al.*, 2008). sCLU è inoltre capace di inibire l'aggregazione e la precipitazione degli anticorpi *in vivo* (Rosenberg *et al.*, 2002), complessarsi con proteine parzialmente unfolded e con molecole idrofobiche nei siti d'infiammazione, solubilizzandole e facilitandone il recupero o l'eliminazione (Poon *et al.*, 2002b).

Una delle caratteristiche che maggiormente accomuna sCLU e le HSP di mammifero è la formazione, in soluzione, di aggregati eterogenei ad alto peso molecolare (Hochgrebe *et al.*, 2000; Carver *et al.*, 2002). Le alterazioni subite dagli aggregati di HSP a seguito di un incremento di temperatura creano una specie chaperone-attiva nella quale le superfici idrofobiche, prevalentemente localizzate all'interfaccia tra le subunità dell'aggregato, sono rese disponibili per legare proteine target (Bova *et al.*, 1997; Haslbeck *et al.*, 1999). Al contrario la distribuzione di sCLU tra differenti forme aggregate è indipendente

dalla temperatura (T), perlomeno in un range compreso tra 37°C e 50°C. Qualora però il parametro T aumenti da 25°C a 80°C sCLU subisce una perdita progressiva e non completamente reversibile sia di struttura secondaria (soprattutto α -eliche) che terziaria, accompagnata da una diminuzione di estensione della regione idrofobica esposta (figura 1.15, A). Nonostante ciò, i cambiamenti strutturali indotti nella molecola da variazioni drastiche di T hanno effetti limitati sulla sua capacità di contattare proteine soggette a stress, che rimane pressoché inalterata (figura 1.15, B).

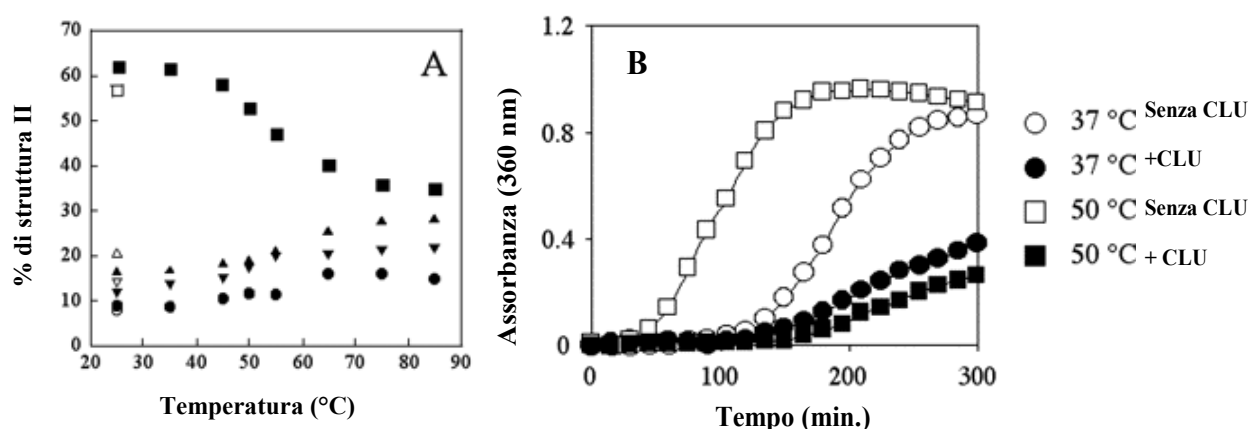


Figura 1.15: Effetti della temperatura su struttura ed attività di sCLU *in vitro*. (A) Dipendenza della temperatura (T) dello spettro CD far-UV di sCLU. Sono indicati la percentuale di α -eliche (■), foglietti β (●), β -turn (▼) e struttura secondaria disorganizzata (▲) in sCLU al variare della T. I corrispondenti simboli vuoti a 25°C rappresentano gli elementi di struttura secondaria dopo riduzione della T da 85°C a 25°C; con il raffreddamento i cambiamenti strutturali sono reversibili, con un aumento del contenuto in α -eliche e riduzione dello stato di disordine. (B) La T e l'attività di chaperone di sCLU. È stata saggiata la precipitazione di BSA indotta da riduzione in DTT a 37°C (●) e 50°C (■), misurando l'assorbanza a 360 nm in funzione del tempo conducendo l'esperimento sia in assenza (simboli vuoti) che in presenza (simboli pieni) di Clusterina. L'aumento di T da 37 a 50°C causa solo un modesto incremento nell'abilità di sCLU di legare proteine soggette a stress (modificato da Poon *et al.*, 2002).

È probabile che il legame di sCLU alla maggior parte dei suoi ligandi avvenga attraverso queste regioni idrofobiche. Risultati pubblicati da Poon *et al.* (2002a) confermerebbero questo meccanismo. Lo stato di aggregazione di sCLU è sensibile al pH, con la forma eterodimerica

Introduzione

della molecola favorita a pH moderatamente acidi (~5.5). Questo fenomeno sembra essere correlato ad un incremento di regioni idrofobiche esposte sulla superficie di sCLU, accompagnato da un'aumentata capacità di legame nei confronti di proteine parzialmente denaturate e da una maggior efficienza nell'inibirne la precipitazione (figura 1.16).

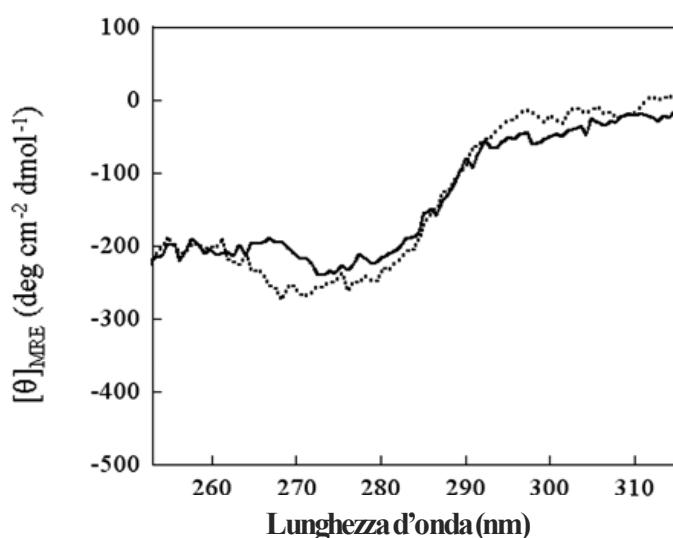


Figura 1.16: Dipendenza dal pH dello spettro CD-near UV di sCLU. Spettro CD-near UV di sCLU in 20 mM di sodio fosfato, pH 7.4 (linea continua) o in 20 mM di MES, pH 5.5 (linea tratteggiata), ottenuti come media di tre scansioni (modificato da Poon *et al.*, 2002).

In contesti fisiologici particolari questi effetti possono avere una significativa importanza. Nei siti di infiammazione, nelle regioni infartuate e nel cervello dei malati di Alzheimer, dove a causa di fenomeni di acidosi il pH scende al di sotto di 6, l'incremento dell'attività di chaperone di sCLU può ridurre la velocità di progressione della malattia inibendo l'aggregazione e l'accumulo di depositi tossici di proteine insolubili.

Per quel che riguarda nello specifico il meccanismo di azione di sCLU, 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 (figura 1.17). Il meccanismo proposto non richiederebbe eccessivi cambiamenti conformazionali di

sCLU e nemmeno dispendio di energia. sCLU quindi agirebbe come chaperone preferendo stati intermedi a lunga vita, lentamente aggreganti, di proteine indirizzate su di una via di off-folding irreversibile alle quali si complessa per prevenirne la precipitazione. Perciò, l'efficienza dell'attività di chaperone dipende non solo da fattori conformazionali ma anche cinetici (Lindner *et al.*, 1997; Lindner *et al.*, 1998; Lindner *et al.*, 2001).

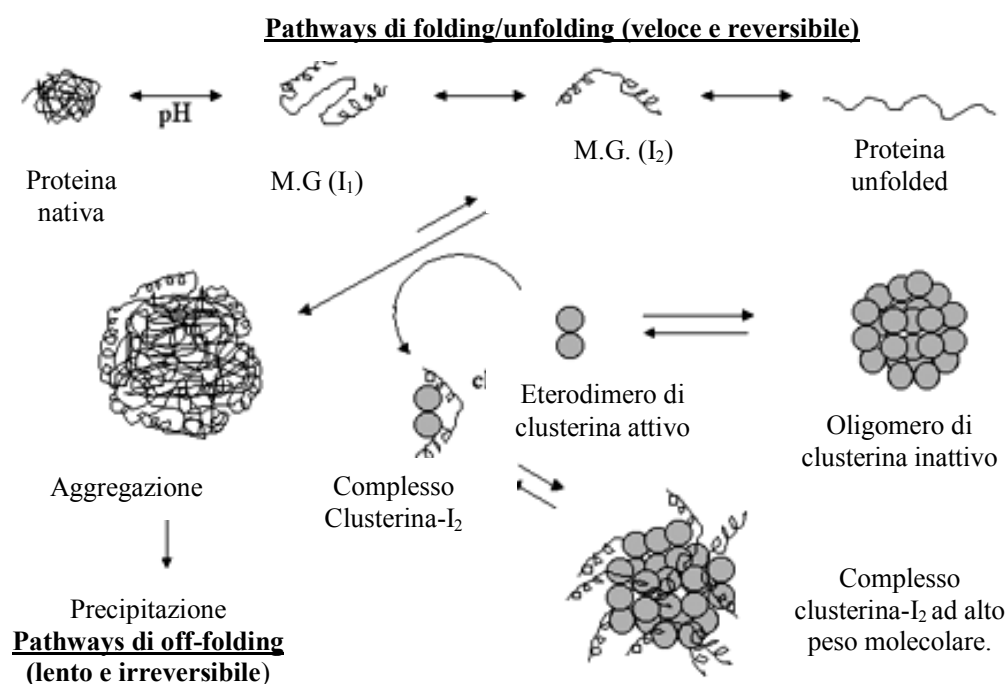


Figura 1.17: Rappresentazione schematica di un possibile meccanismo per l'attività di chaperone di sCLU. Sotto condizioni di stress (come un decremento di pH), le proteine native possono denaturare adottando una serie di stati (denominati I_1 ed I_2 nell'immagine) parzialmente folded (molten globule) i quali espongono superfici idrofobiche in soluzione. I_2 può aggregare ed entrare in un pathway di off-folding potenzialmente irreversibile. Lungo questo pathway, la forma eterodimerica chaperone-attiva di sCLU interagisce e si lega ad I_2 , il quale viene così sequestrato in un grosso complesso. La concentrazione dell'eterodimero di sCLU incrementa a pH acidi, a seguito di shift nell'equilibrio della forma oligomerica. Il meccanismo non richiederebbe input di energia (modificato da Poon *et al.*, 2002).

L'azione di chaperone di sCLU, oltre ad essere caratterizzata da un'ampia specificità, è efficace nell'inibire la precipitazione stress-indotta di svariate proteine con caratteristiche strutturali divergenti

Introduzione

(Poon *et al.*, 2000). La tabella 1.2 riassume le caratteristiche fisiche e l'effetto di condizioni di stress su proteine che si sono rivelate substrati per l'attività di chaperone di sCLU.

Tabella 1.2: Substrati proteici per i quali sCLU ha mostrato capacità di inibire la precipitazione stress-indotta^a (modificato da Lakins JN *et al.*, 2002).

Proteina	Localizzazione	Massa (kDa)	Ponti S-S	Struttura II	Induzione dello stress
ADH	Intracellulare	147	No	α -eliche, β -sheet	Calore
BSA	Extracellulare	66.4	Si	α -eliche, β -sheet	Riduzione
Catalasi	Intracellulare	230	Si	α -eliche, β -sheet	Calore
GST	Intracellulare	51	No	α -eliche, β -sheet	Calore
IgG	Extracellulare	150	Si	β -sheet	Calore
α -Lactoalbumina	Extracellulare	14.1	Si	α -eliche, β -sheet	Riduzione
Lisozima	Extracellulare	14.3	Si	α -eliche, β -sheet	Riduzione a 42°C

^a Molti dei dati mostrati sono informazioni ricavate dal SwissProt Database. La massa non include il contributo dato dalla glicosilazione.

Nonostante l'analisi di predizione della sequenza abbia rilevato un possibile motivo che lega nucleotidi e la maggior parte delle chaperones abbia siti leganti ATP e/o attività ATP-asi, richieste per il refolding proteico (Tsuruta *et al.*, 1990; Humphreys *et al.*, 1999), *in vitro*, sCLU inibisce la precipitazione stress indotta di un'ampia varietà di substrati, legando con alta affinità, attraverso un meccanismo ATP-indipendente, porzioni unfoldate della molecola proteica. L'attività di chaperone di sCLU può esercitarsi sia a livello intra- che extra-cellulare. Mancando di funzione ATP-asi, quando sCLU agisce da chaperone intracellulare su proteine soggette a stress *in vitro*, coopera con chaperone ATP-dipendenti per facilitare la stabilizzazione ed il refolding di tali molecole (Poon *et al.*, 2000). È possibile anche che la sCLU possa legare e prevenire l'aggregazione di proteine extracellulari sulla superficie di cellule soggette a stress; le proteine così stabilizzate potrebbero essere refolded, recuperando la loro

normale funzione, tramite l'attività di chaperones extracellulari ATP-dipendenti.

L'attività di chaperone molecolare *in vivo*

sCLU, data la sua attività di chaperone extracellulare e la sua presenza in più fluidi biologici, è stata trovata associata a depositi di proteine extracellulari collegati a molte malattie, compresi ad esempio i depositi amiloidi (Yerbury *et al.*, 2007). Ciò suggerisce che sCLU sia in grado di legare proteine unfolded *in vivo* e che possa trovarsi incorporata in aggregati insolubili quando la sua attività di chaperone viene sopraffatta da un eccesso di proteine unfolded.

Recentemente è stato riportato come diverse proteine secrete abbiano *in vitro* un'attività di chaperone. Queste includono il fibrinogeno (Tang *et al.*, 2009), l'albumina (Marini *et al.*, 2005), l'apolipoproteina E (Wood *et al.*, 1996), l'aptoglobina (Yerbury *et al.*, 2005a) e l' α_2 -macroglobulina (French *et al.*, 2008). Proprio l'aptoglobina e l' α_2 -macroglobulina formano assieme a sCLU un piccolo gruppo di proteine secrete con funzioni simili. Esse mostrano l'abilità di legare stabilmente proteine misfolded e, quindi, inibiscono inappropriate interazioni proteina-proteina, prevenendone l'aggregazione e mantenendole in soluzione. Ognuna di queste chaperones extracellulari (ECs) è riconosciuta da specifici recettori sulla superficie delle cellule che ne permette l'internalizzazione, in complesso con il ligando, e la successiva degradazione a livello lisosomiale (Graversen *et al.*, 2002). Un possibile meccanismo per l'attività di queste ECs è mostrato in figura 1.18 (Wyatt *et al.*, 2009a). Lo stato di unfolding di proteine patologiche, o sottoposte a stress, consiste in intermedi parzialmente strutturati (o stati di *molten globule*), normalmente presenti nel corso del processo di folding. Questi intermedi sono potenzialmente instabili e a lunga vita

Introduzione

poiché espongono ampie superfici idrofobiche in soluzione che facilitano la loro aggregazione. Tale pathway comporta processi dinamici di associazione/dissociazione con la precipitazione come evento finale (Poon *et al.*, 2002b). In pratica le ECs legherebbero le regioni idrofobiche delle proteine extracellulari per formare complessi solubili, in seguito internalizzati tramite un processo di endocitosi mediata da recettori e degradati dagli enzimi proteolitici all'interno dei lisosomi. Il fegato ed il sistema reticolo-endoteliale contribuirebbero in misura maggiore all'eliminazione *in vivo* dei complessi EC-proteina target (Yerbury *et al.*, 2005b).

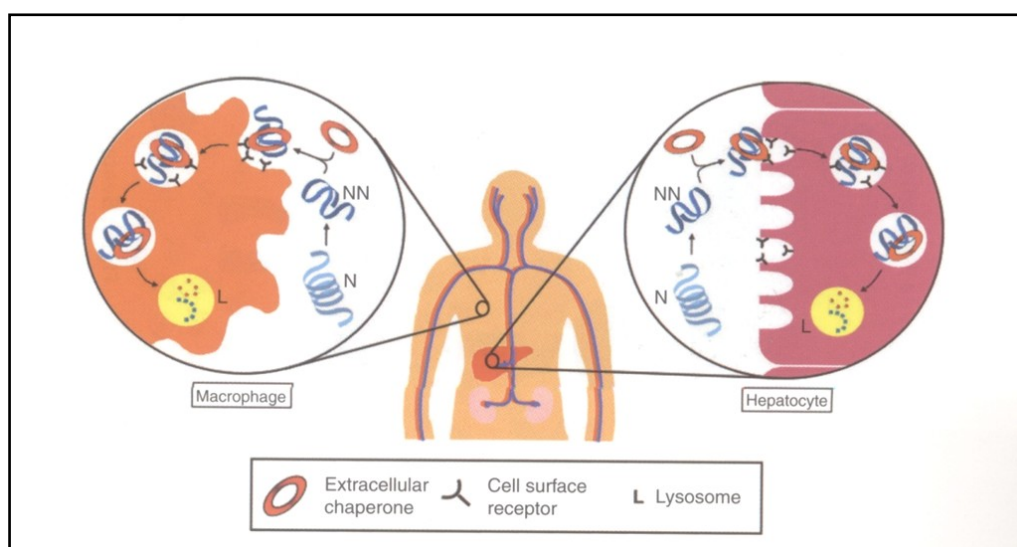


Figura 1.18: Modello speculativo dell'eliminazione chaperone-mediata di proteine non native. Proteine extracellulari non native si legano a chaperones extracellulari che mediano il loro ingresso all'interno delle cellule attraverso endocitosi mediata da recettori. I recettori vengono poi riciclati e riportati sulla superficie della cellula (tratto Wyatt *et al.*, 2009a).

Nel caso in cui questo modello fosse corretto ci si potrebbe aspettare di rilevare complessi EC-proteine target *in vivo*. In effetti sia la sCLU che l' α_2 -macroglobulina si trovano complessate con proteine prioniche nei fluidi umani extracellulari (Adler e Kriukov, 2007; Ecroyd *et al.*, 2005).

L'identificazione di proteine target endogene di sCLU nei fluidi biologici ha rappresentato un importante punto per il chiarimento del ruolo di questa nel controllo della qualità del folding di proteine extracellulari. L'analisi di campioni di plasma mediante cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) indica come, campioni di plasma sottoposti a stress termici, contengano più specie proteiche solubili ad alto peso molecolare e come queste siano molto più abbondanti quando, proteine purificate mediante cromatografia per affinità anti-CLU dal plasma sottoposto a stress, vengono comparate con quelle purificate dai campioni di controllo.

SDS-PAGE e analisi Western Blot hanno evidenziato come un'ampia varietà di proteine co-purificati con sCLU sia da campioni di plasma sottoposti a stress che dai rispettivi controlli. Fra queste proteine, identificate con spettrometria di massa, sono presenti albumina (HSA), fibrinogeno (FGN) e ceruloplasmina (CERU) (figura 1.19). In condizioni di stress tali proteine possono aggregarsi portando alla formazione di complessi insolubili ($>4 \times 10^7$ Da) oppure essere stabilizzati da ECs come sCLU. L'incorporazione negli aggregati in crescita spiegherebbe l'apparente deplezione di CLU dal pool di proteine solubili del plasma sottoposto a stress (Wyatt e Wilson, 2010).

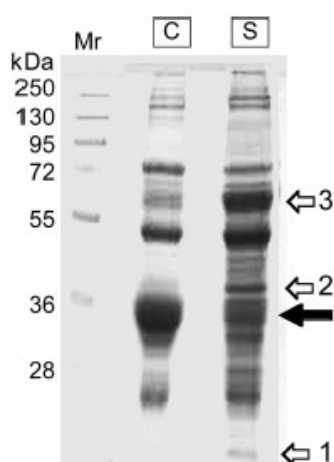


Figura 1.19: SDS-PAGE di proteine purificate da plasma umano mediante cromatografia di immunoaffinità con antiCLU.

In figura sono mostrate le proteine isolate da plasma fresco (C) o sottoposto a stress (S). Le frecce vuote indicano le bande individuate attraverso analisi spettrometrica (1=CERU, 17 kDa; 2= FGN, 43 kDa; 3= HSA e CERU, 67 kDa). La freccia nera indica la posizione di sCLU (modificato da Wyatt e Wilson, 2010).

Introduzione

Successivi studi condotti *in vitro* sulla generazione di aggregati tra sCLU ed altre proteine, hanno permesso di chiarire le caratteristiche fisiche di questi complessi. A tale scopo sono stati creati *in vitro* i complessi ad alto peso molecolare CLU-fibrinogeno (FGN), CLU-glutatione S-transferasi (GST) e CLU-citrato sintasi (CS), studiandone proprietà e caratteristiche chimico-fisiche per giungere alle seguenti conclusioni:

1. l'analisi densitometrica di SDS-PAGE colorati con Comassie Blue indica come il rapporto stechiometrico sCLU:proteina target in tutti i complessi è di circa 1:2;
2. l'analisi SEC ha evidenziato come FGN, GST e CS formino complessi con CLU di peso superiore a 4×10^7 Da;
3. misure di fluorescenza bisANS suggeriscono come l'azione di chaperone di sCLU coinvolga l'esposizione preventiva al solvente acquoso di regioni idrofobiche normalmente esposte dalle proteine target durante l'unfolding indotto da stress termico.

Quindi, *in vivo*, il sequestro di proteine misfolded in grandi complessi solubili con CLU probabilmente rappresenta il primo meccanismo che interviene ad impedire la formazione di aggregati tossici o comunque patologici. Questi complessi sarebbero poi rapidamente eliminati dal corpo mediante endocitosi mediata da recettori e successiva degradazione lisosomiale (Wyatt *et al.*, 2009b).

- **Clusterina intracellulare (nCLU e cCLU)**

Nel 1996 Reddy e colleghi hanno dimostrato sperimentalmente per la prima volta l'esistenza di una forma nucleare di CLU (nCLU). La forma intracellulare della proteina risultò indotta in risposta al trattamento con TGF- β (Trasforming Growth Factor β) (Reddy *et al.*, 1996). Pochi anni dopo anche Yang e colleghi nella linea cellulare di carcinoma mammario MCF7:WS8 irradiata con radiazioni ionizzanti identificarono una forma nucleare di CLU di 55 kDa (Yang *et al.*, 2000). In seguito

altri autori hanno confermato in linee cellulari tumorali sottoposte a stress di vario genere, come radiazioni ionizzanti (IR; Leskov *et al.*, 2003), deprivazione di siero (Caccamo *et al.*, 2004) o di calcio (Cacciamo *et al.*, 2005) e heat-shock, (Cacciamo *et al.*, 2006) la produzione di una forma troncata di CLU non clivata né glicosilata di 45-55 kDa che si localizza a livello nucleare. Vari gruppi di ricerca hanno proposto meccanismi diversi in grado di spiegare la presenza di CLU in compartimenti citoplasmatici e/o nucleari che includono l'utilizzo di un inizio alternativo della trascrizione in linee cellulari endoteliali stimulate con TGF- β (Reddy *et al.*, 1996); un evento di splicing alternativo in cellule MCF7 esposte a IR (Leskov *et al.*, 2003); un inizio di traduzione in siti alternativi in cellule di cancro prostatico (figura 1.20) (Moretti *et al.*, 2007); una retrotraslocazione della proteina in maturazione in cellule stressate dall'apparato del Golgi al citosol mediante un pathway ERAD simile (Nizard *et al.*, 2007); una ri-internalizzazione di sCLU dall'ambiente extracellulare al citosol (Kang *et al.*, 2005).

Inoltre il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che, in linee cellulari epiteliali prostatiche (PC3 e PNT1a), la rimozione della sequenza leader dal cDNA di sCLU comporta la produzione di una proteina di 49 kDa, il cui peso molecolare corrisponde a quello atteso per la forma non clivata e né glicosilata di Clusterina (Scaltriti *et al.*, 2004a). Tuttavia è importante notare che le forme intracellulari di CLU non sono state né isolate né sequenziate in nessuno dei lavori appena descritti, perciò non è possibile discriminare quale sia il meccanismo esatto che porta alla produzione di queste proteine, ne tanto meno predirne la struttura tridimensionale.

Ad nCLU è stata associata una funzione proapoptotica, in quanto, la sua over-espressione conduce a morte cellulare per apoptosi sia in cellule tumorali di prostata (Caccamo *et al.*, 2003, 2004, 2005; Moretti *et al.*, 2007; Scaltriti *et al.*, 2004a, 2004b) che in linee di

Introduzione

carcinoma mammario (Yang *et al.*, 2000 Leskov *et al.*, 2003). nCLU sembra sia in grado di legarsi ad un complesso ku70/Ku80 interferendo con il sistema di riparazione del DNA a doppio filamento (Yang *et al.*, 2000).

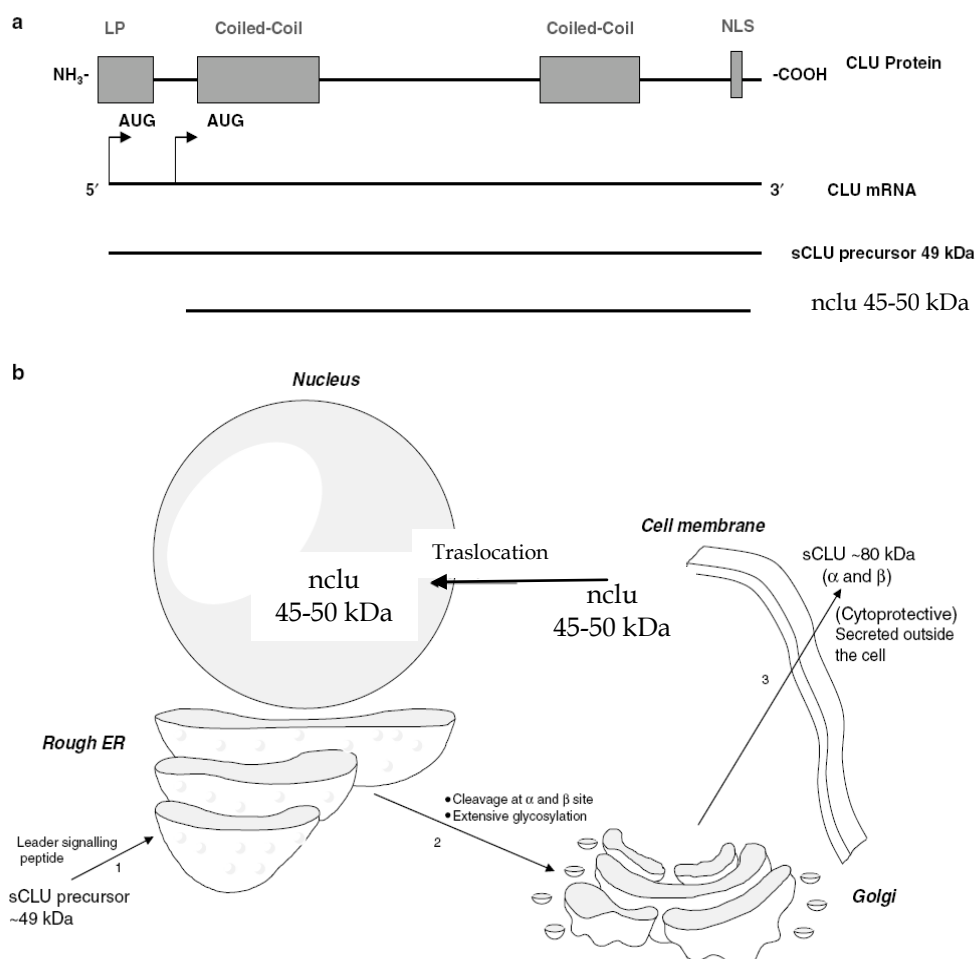


Figura 1.20: Produzione di sCLU ed nCLU. (a) Il precursore di sCLU deriva dalla traduzione a partire dall'AUG in esone 2, la forma nucleare può derivare da un messaggero alternativo o per traduzione a partire dall'AUG in esone 3. **(b)** Il precursore della forma secreta viene indirizzato all'ER dal peptide leader, viene clivato, estensivamente glicosilato e trasportato nel Golgi. La CLU nucleare risiede nel citoplasma di cellule non stressate e viene traslocata nel nucleo in risposta ad uno stimolo dannoso (modificata da Shannan *et al.*, 2006).

1.3 CLUSTERINA E TUMORIGENESI

1.3.1 Clusterina, apoptosi e regolazione del ciclo cellulare

È stato osservato che l'mRNA di CLU risulta fortemente sovraespresso nella prostata di ratto in seguito a castrazione chirurgica (Bettuzzi *et al.*, 1989). Questo fenomeno fu inizialmente associato al fatto che gli androgeni fossero dei repressori dell'espressione di CLU. In seguito CLU fu trovata sovraespressa in molti modelli di apoptosi e regressione cellulare, e pertanto fu proposta come marcatore del fenomeno apoptotico (Lakins *et al.*, 1998). Altri hanno invece dimostrato che CLU, in particolare la forma secreta, sia piuttosto un fattore citoprotettivo, up-regolato in numerose linee tumorali a seguito del trattamento con chemioterapici, in grado di mediare la resistenza all'apoptosi indotta da quest'ultimi (Trogakos *et al.*, 2004; Gleave e Myake, 2005).

Il contributo del nostro laboratorio a questa apparente incongruenza scientifica è stato lo sviluppo di vettori plasmidici per la sovraespressione di CLU in sistemi cellulari eucariotici e la selezione di cloni di cellule epiteliali prostatiche stabilmente sovra-esprimenti CLU. In particolare abbiamo verificato come la sovraespressione transiente di CLU in cellule epiteliali prostatiche immortalizzate (PNT1a) per mezzo di un plasmide inducibile causi riduzione della proliferazione e rallentamento del ciclo cellulare (Bettuzzi *et al.*, 2002). La sovraespressione costitutiva di CLU in cellule PNT1a ed in cellule epiteliali prostatiche trasformate (PC3) è stata realizzata mediante trasfezione con un vettore di espressione tipo p-IRES- hyg e successiva selezione clonale con antibiotico. I vettori tipo p-IRES-hyg sono plasmidi nei quali a valle del Multi Cloning Site (MCS), regione nella quale viene clonato il c-DNA di interesse, si ritrova una sequenza IRES (Internal Ribosome Entry Site) posta immediatamente

Introduzione

prima della sequenza codificante per la resistenza all'igromicina (Scaltriti *et al.*, 2004a). Con questo sistema di espressione si ottiene la trascrizione di un solo messaggero nella cellula eucariotica, codificante sia per il gene di interesse, nel nostro caso CLU, sia per la resistenza all'antibiotico, l'igromicina. In questo modo si ha il vantaggio di ridurre la possibilità di ottenere al momento della selezione clonale falsi positivi. CLU, stabilmente sovraespressa in cellule epiteliali prostatiche, causa tossicità clonogenica in entrambe le linee cellulari impiegate, anche se, tale effetto è più marcato nella linea cellulare tumorale PC3 (figura 1.21).

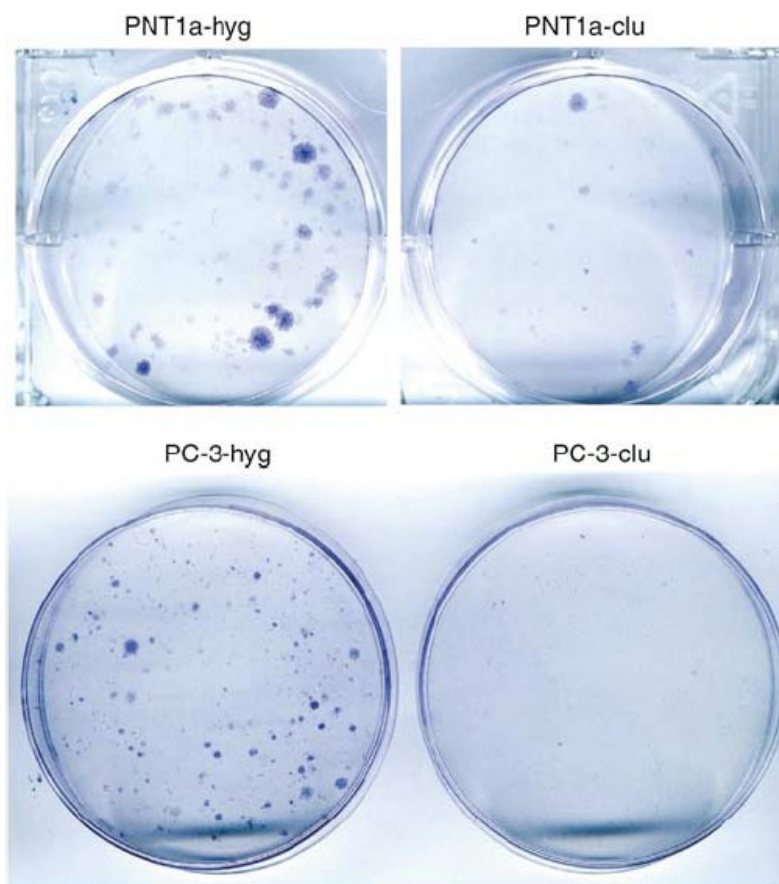


Figura 1.21: Tossicità clonogenica della CLU. Dopo 14 giorni di selezione con igromicina B le colonie igromicina-resistenti di cellule epiteliali prostatiche sovraesprimenti CLU (PNT1a-CLU, PC3-CLU) sono più piccole e meno numerose dei rispettivi controlli trasfettati con il vettore vuoto (PNT1a-Hyg, PC3-Hyg). Le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% e colorate con GIEMSA (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004a).

I pochi cloni ottenuti sono caratterizzati da una ridotta velocità di duplicazione cellulare rispetto ai controlli esprimenti la sola resistenza all'igromicina, come dimostrato dalle curve di proliferazione riportate in figura 1.22.

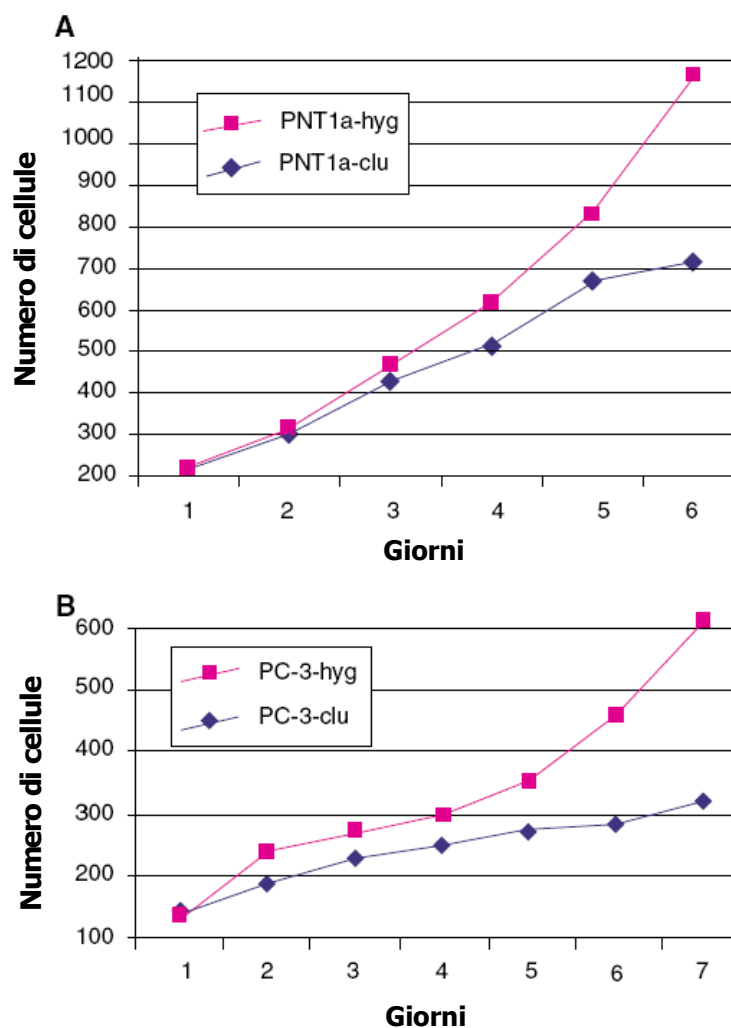


Figura 1.22: Curve di proliferazione di cloni costitutivi derivanti da cellule PNT1a (A) o PC3 (B). PC3-CLU e PNT1a-CLU, cloni sovraesprimenti CLU, PC3-Hyg e PNT1a-Hyg controlli mock. I cloni sovraesprimenti CLU hanno una crescita più lenta rispetto ai relativi controlli (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004a).

Il meccanismo attraverso cui CLU riduce la velocità di duplicazione cellulare nelle due linee cellulari è però differente, e dall'analisi del ciclo cellulare è stato possibile comprendere come. Mentre la ridotta proliferazione delle cellule epiteliali immortalizzate è dovuta

Introduzione

prevalentemente a morte cellulare ed accumulo di cellule in fase G_0/G_1 , il rallentamento del tempo di duplicazione delle cellule PC3 è dovuto ad un blocco del ciclo in fase G_2 -M. Tale blocco porta ad una marcata alterazione della morfologia cellulare, caratterizzata dalla presenza di cellule giganti e polipoidi (Scaltriti *et al.*, 2004a), come se queste cellule riuscissero a entrare nella fase S, duplicando il materiale cellulare, ma non fossero capaci di completare correttamente la mitosi. È interessante notare che in queste cellule la localizzazione di CLU è citoplasmatica e non si ritrova mai la forma nucleare pro-apoptotica precedentemente descritta (figura 1.23).

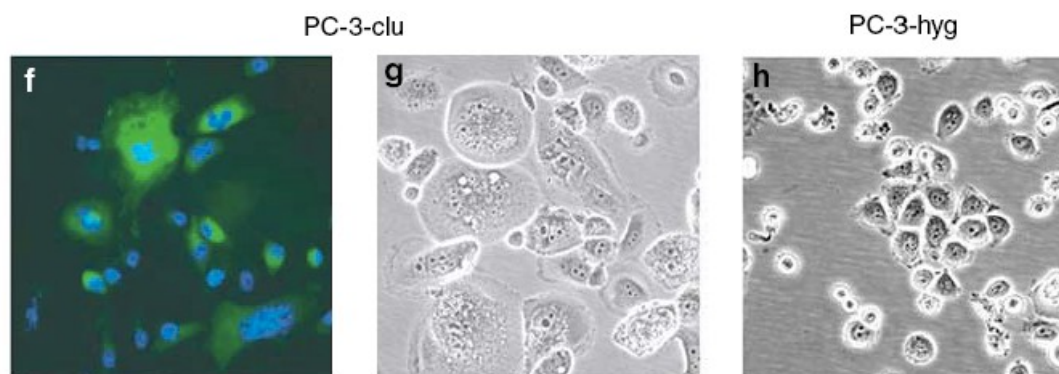


Figura 1.23: Morfologia dei cloni PC3 sovraespressanti CLU. Cellule giganti sovraespressanti Clusterina. **(f)** immunocitochimica con anticorpo fluorescente anti-CLU e marcatura dei nuclei con DAPI. Si nota la localizzazione citoplasmatica di CLU. **(g-f)** immagine in contrasto di fase di cloni espressanti CLU o la sola resistenza all'igromicina (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004a).

Nel complesso quindi è possibile affermare che solo le cellule capaci di sopravvivere all'effetto di tossicità clonogenica di CLU, ovvero quelle che in qualche modo si sono adattate sviluppando una tolleranza ad alti livelli di proteina, sono resistenti all'apoptosi; non di meno hanno comunque difficoltà replicative e risultano meno proliferanti dei controlli. Non è corretto invece ritenere che la sovraespressione di CLU di per sé conferisca resistenza all'apoptosi, dal momento che l'elevata espressione di questa proteina produce

marcati effetti citotossici in entrambe le linee cellulari in fase di selezione clonale.

La sovra-espressione transiente, in cellule PC3, di una forma troncata della proteina (nCLU), ottenuta clonando il c-DNA di CLU a partire dall'AUG presente nell'esone 3, porta ad un massivo accumulo della proteina a livello nucleare, ed è associata a blocco del ciclo cellulare in fase G2-M e a morte cellulare per apoptosi caspasi dipendente (Scaltriti *et al.*, 2004b; figura 1.24).

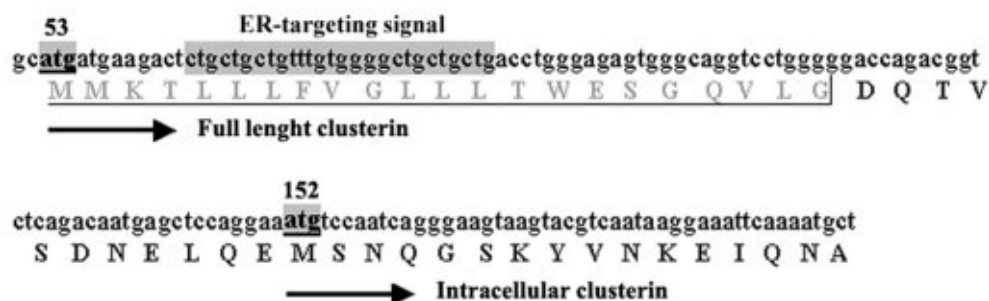


Figura 1.24: Open reading frame codificanti per sCLU (forma di secrezione) e per la CLU troncata (forma intracitoplasmatica, icCLU). La sCLU è stata clonata a partire dall'ATG in posizione 53 (esone 2), mentre il cDNA di nCLU parte dall'ATG in posizione 152 (esone 3) della stessa sequenza, GeneBank accession no. M64722 (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004b).

L'espressione costitutiva di nCLU in cellule PC3 ricombinanti si associa ad elevata tossicità clonogenica e i pochi cloni isolati sono costituiti da cellule giganti, multinucleate, nelle quali CLU si localizza nel solo comparto citoplasmatico, suggerendo una correlazione negativa tra l'accumulo di nCLU e la sopravvivenza cellulare (figura 1.25).

Le alterazioni morfologiche riscontrate in questi cloni correlano con l'arresto della progressione del ciclo cellulare al check point G₂-M e con la down-regolazione del complesso ciclina B₁/CDK1, necessario per la corretta transizione dalla fase G2 alla fase M del ciclo cellulare (Scaltriti *et al.*, 2004b; figura 1.26).

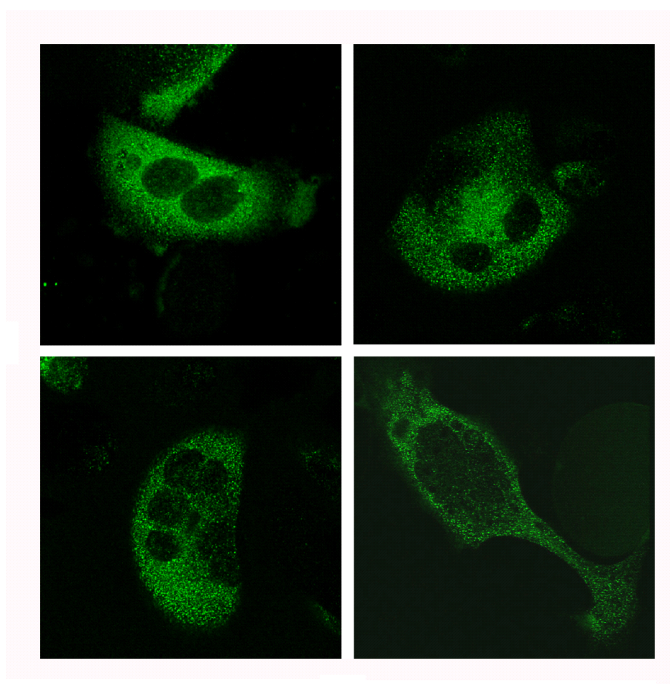


Figura 1.25: Cellule PC3 sovraesprimenti nCLU in modo costitutivo. La localizzazione della proteina nei pochi cloni sopravvissuti alla sovraespressione di nCLU è esclusivamente citoplasmatica. Le cellule sono giganti, multinucleate, con segni evidenti di endoreduplicazione (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004b).

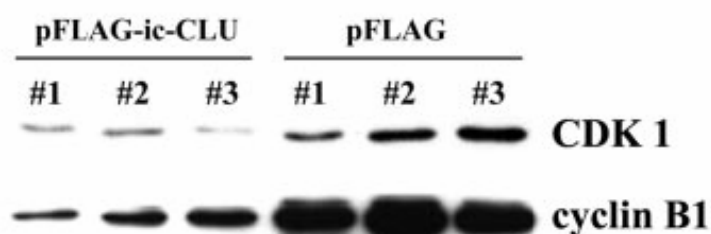


Figura 1.26: Down-regolazione del complesso ciclina B1/CDK1 in cloni sovra-esprimenti nCLU. Analisi Western-blot dell'espressione della ciclina B1 e della CDK1 in cellule PC3 esprimenti costitutivamente la forma troncata intracitoplasmatica di CLU (pFLAG-ic-CLU) o il vettore vuoto (pFLAG) (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004b).

Altri autori hanno cercato di comprendere la correlazione esistente fra l'espressione di CLU e l'apoptosi. In particolare è stato verificato che l'espressione di CLU è direttamente regolata da B-Myb, un fattore di trascrizione coinvolto nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza cellulare e nel processo di differenziamento (Cervellera *et al.*, 2000). Inoltre è stato riportato che CLU regola l'espressione

del fattore di trascrizione NF- κ B, stabilizzandone gli inibitori I κ Bs e modulandone negativamente l'attività (Santilli *et al.*, 2003).

I meccanismi che legano CLU all'apoptosi non sono ancora noti, ma come già accennato in precedenza, è stata proposta una funzione, mediata dalla forma nucleare di CLU, nell'ambito dei meccanismi di riparazione dei danni al DNA, che è collegata all'induzione di morte programmata. È stato infatti verificato che nCLU, ma non la forma di secrezione, sia in grado di legare la proteina KU-70, formando un complesso trimerico con KU-80 (Yang *et al.*, 2000), due proteine chinasi DNA-dipendenti del sistema di riparo del DNA a doppio filamento. Il legame di nCLU al complesso KU-70/KU-80 impedirebbe la riparazione del danno al DNA, commissionando la cellula verso la morte apoptotica. Dati recenti indicano che la proteina KU-70 possa legare la proteina pro-apoptotica Bax inattivandola (Sawada *et al.*, 2003). Sembra che nCLU sia in grado di legare KU-70, dissociando il complesso citoprotettivo Bax-Ku70, e rendendo disponibile Bax all'induzione di apoptosi.

1.3.2 Clusterina e motilità cellulare

La motilità cellulare e la capacità di migrazione sono funzioni cellulari implicate nella invasività e nella diffusione metastatica dei tumori. E' stato osservato che la sovraespressione di sCLU è in grado di ridurre la motilità cellulare in cellule epiteliali prostatiche immortalizzate (PNT1a), ma non in cellule tumorigeniche (PC3, DU145) (Moretti *et al.*, 2007); la sovraespressione della forma troncata di CLU (nCLU) invece è in grado di ridurre significativamente la proliferazione e la motilità cellulare sia in cellule non tumorigeniche, che in cellule trasformate (figura 1.27).

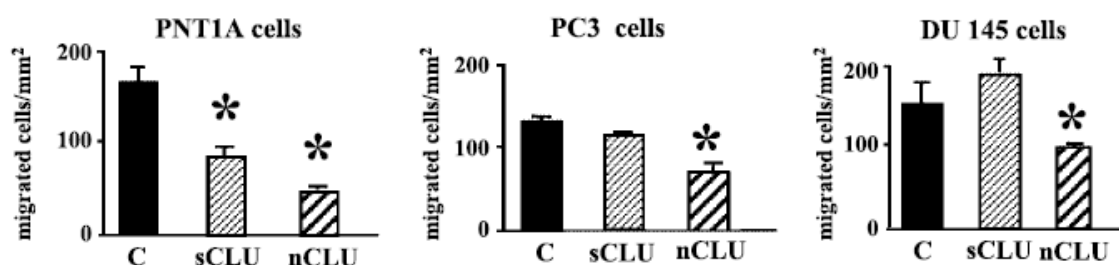


Figura 1.27: Effetti della sovraespressione di CLU sulla capacità migratoria di cellule prostatiche. Le cellule trasfettate transientemente con la forma di CLU destinata alla secrezione (sCLU), o con la forma troncata (nCLU), sono state seminate, in egual numero, nello scomparto superiore di una camera di Boyden e soggette ad opportuno stimolo chemiotattico. In grafico si riporta il numero di cellule che si ritrova, dopo migrazione nel comparto inferiore della cameretta. sCLU è in grado di ridurre la motilità solo in cellule immortalizzate, mentre nCLU produce effetti antimigratori significativi anche nelle cellule tumorali. C= controllo, cellule trasfettate con vettore vuoto (tratto da Moretti *et al.*, 2007).

È stato pertanto proposto che solo la forma troncata, pro-apoptotica di CLU, possieda caratteristiche antimigratorie e che solo le cellule immortalizzate, non tumorigeniche, siano in grado di produrre la forma troncata, non glicosilata, di circa 49 kDa (nCLU) a partire dal c-DNA full-length esogeno, con un meccanismo di traduzione alternativa. La nCLU inibisce la migrazione delle cellule tumorali prostatiche attraverso una interazione diretta con le proteine del citoscheletro, infatti la sovraespressione di nCLU in cellule prostatiche normali e tumorigeniche si associa ad uno smantellamento della struttura citoscheletrica costituita dalle fibre di actina (Moretti *et al.*, 2007), mostrato in figura 1.28.

Gli stessi autori hanno proposto che la disorganizzazione del citoscheletro è dovuta ad una interazione diretta fra nCLU ed α -actinina. Quest'ultima proteina forma legami crociati con l'actina, modulando la rigidità e l'organizzazione strutturale del citoscheletro, ed influenzando così le caratteristiche di migrazione cellulare. CLU quindi appare implicata nel controllo delle capacità migratorie delle cellule prostatiche. In particolare, nelle cellule tumorali potrebbero

essere messi in atto meccanismi ancora non chiariti, atti a inibire la produzione della forma troncata nCLU, cui si devono le capacità antimigratorie. È pertanto possibile che l'alterato pattern di forme proteiche di CLU, che si ritrova nelle cellule prostatiche trasformate sia uno dei fenomeni implicati nella tumorigenesi.

Inoltre, in cellule di neuroblastoma, è stato verificato che la sovraespressione di CLU è in grado di ridurre significativamente la motilità e l'invasività cellulare, riducendo l'attività di NF- κ B, attraverso una stabilizzazione dei suoi inibitori I κ B α ed I κ B β (Santilli *et al.*, 2003).

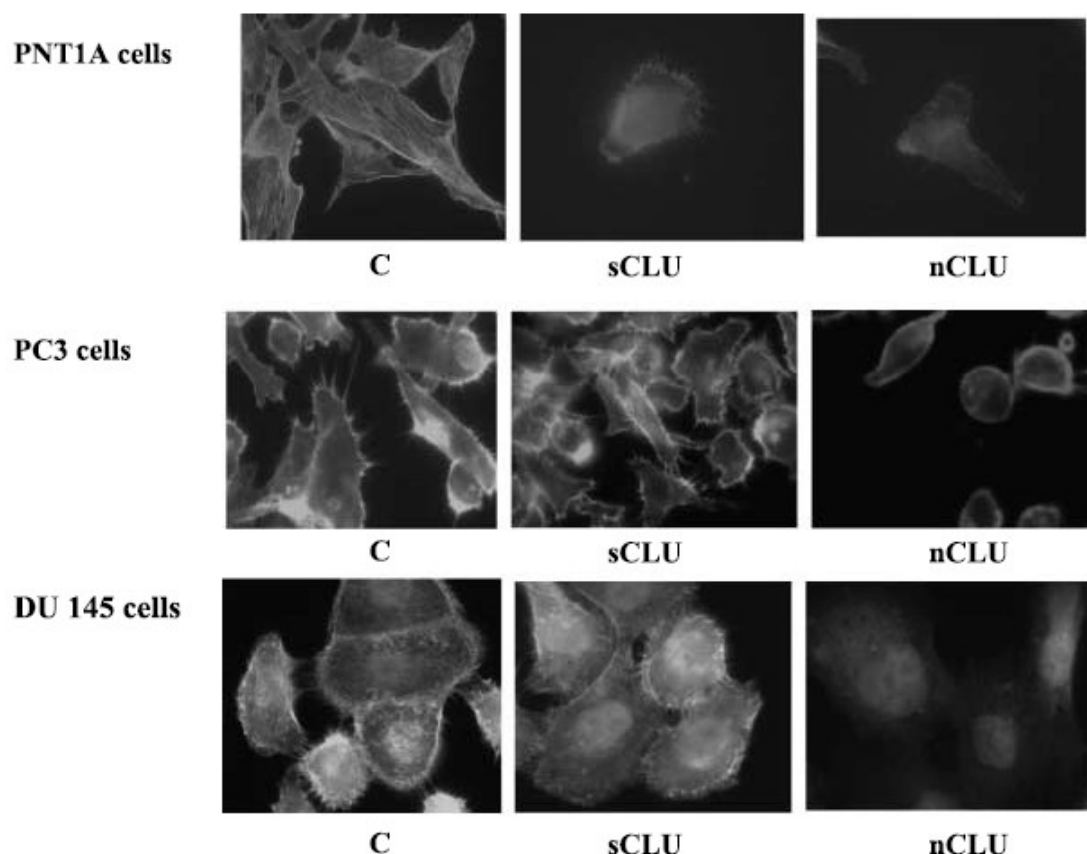


Figura 1.28: Marcatura immunofluorescente con FITC-falloidina della F-actina in cellule prostatiche. Cellule trasfettate con C = vettore vuoto; sCLU = CLU full-length; nCLU= CLU troncata. La sovraespressione di nCLU, causa un massiccio smantellamento dell'architettura del citoscheletro sia in cellule prostatiche normali, che in cellule prostatiche trasformate (tratto da Moretti *et al.*, 2007).

1.3.3 Espressione di Clusterina in cellule tumorali, modelli tumorali murini e tumori

L'espressione di CLU, in cellule tumorali, può essere modulata da una grande varietà di composti chemioterapici d'impiego sperimentale o clinico. Gli analoghi della 1,25-di-idrossi-vitamina D₃ sono in grado di inibire la proliferazione e indurre apoptosi in una grande varietà di linee cellulari. È stato dimostrato che l'impiego di BXL-628, un analogo della 1,25(OH)₂ vitamina D₃, induce aumento dell'espressione di CLU in cellule prostatiche iperplastiche *in vivo* ed *in vitro* concomitantemente con l'induzione di atrofia e inibizione della proliferazione cellulare (Crescioli *et al.*, 2004).

Numerosi fattori che mediano la crescita e la proliferazione cellulare come il Nerve Growth Factor (NGF), o l'Epidermal Growth Factor (EGF), inducono la trascrizione del messaggero di CLU in cellule tumorali prostatiche (Gutacker *et al.*, 1999). Anche il fattore TGF-β₁ è in grado di indurre la trascrizione dell' mRNA di CLU.

La sovraespressione del proto-oncogene c-fos è in grado di reprimere l'espressione di CLU indotta da TGF-β₁ (Jin e Howe, 1999). Gli autori hanno pertanto speculato che TGF-β₁ possa in qualche modo esercitare effetti sulla sintesi o sulla stabilità di c-Fos, che portano ad una riduzione della sua espressione e ad un aumento dell'espressione di CLU.

In modo più convincente, numerose evidenze concordano nel ritenere che *CLU* possa svolgere un ruolo come tumor-suppressor gene, e che eventi precoci nella tumorigenesi, come la trasformazione con oncogeni della famiglia delle proteine RAS, ne regolino attivamente l'espressione. L'attivazione delle proteine RAS, dovuta ad alcune mutazioni puntiformi, si riscontra frequentemente in numerosi tipi di cancro, inclusi il cancro del colon, del polmone, della tiroide e del pancreas. Si tratta di una famiglia di piccole proteine leganti il GTP, che agiscono nella cellula come interruttori principali nella

trasmissione di segnali extracellulari, attivando una cascata di eventi citoplasmatici. Gli oncogeni della famiglia RAS sono il risultato di una mutazione genica che blocca la proteina nello stato attivato; essi contribuiscono alla tumorigenesi, all'angiogenesi ed all'invasione metastatica attivando costitutivamente la cascata di chinasi citoplasmatiche coinvolte a loro volta nell'attivazione di numerosi fattori di trascrizione (AP-1, NF- κ B, c-Myc, SRF, Ets), che modulano l'espressione di specifici geni coinvolti in questi processi. CLU è consistentemente down regolata in linee cellulari trasformate da RAS (Klock *et al.*, 1998; Tchernitsa *et al.*, 2004), mentre la sovraespressione di CLU correla con la soppressione della tumorigenesi, concomitantemente con la downregolazione di HRAS (Kyprianou *et al.*, 1991).

L'espressione di CLU è alterata nella maggior parte delle neoplasie umane e questo ha contribuito a tenere alta l'attenzione dei ricercatori nei confronti di questa proteina. Non esiste ad oggi un accordo comune sul fatto che essa rappresenti un fattore di promozione della trasformazione neoplastica, piuttosto che un fattore limitante la tumorigenesi.

Numerosi studi di espressione genica, condotti in tumori di vario tipo, indicano che CLU è consistentemente down-regolata a livello trascrizionale nella maggioranza dei tumori (figura 1.29). Queste informazioni possono essere facilmente recuperate attraverso il database di libero accesso del sito web Oncomine (<http://www.oncomine.org>), che raccoglie e confronta i dati di espressione genica di oltre 14.000 differenti studi di microarray.

Introduzione

P-value threshold: 1E-4		+ -		Outlier rank threshold: 50							+ -	
	Normal vs. normal	Cancer vs. normal	Cancer vs. cancer	Histologic subtype	Molecular alteration	Misc	Tumor stage	Tumor grade	Outlier			
Adrenal	1											
Bladder	1	1		1			1					
Brain	2	4	2 2			2						
Head-neck	4	1								1		
Liver	1	2	1			1						
Others	1 2	1										
Peripheral nervous system	2											
Spinal cord	4											
Testis	3	1										
Tonsil	1											
Colon		1 1									1	
Renal	2	1	1 1			2 1						
Breast		2	1 2	1	2	2		5		1		
CellLine			1 4		2 1	9 6				3		
Leukemia		2	1 2	2 1	4 3	1				3		
Lung		3	2 1									
Lymphoma		1	3 6			2				1		
Multicancer			7 5			1						
Prostate		7	1 3			6	1	1				
Sarcoma			7 6			1 1	1			1		
Central nervous system						2						
Ovarian						1						
Parathyroid						1						
Gastric											1	
Melanoma		1				1				1		
Blood	1											
Bone marrow	2											
Cardiac	1											
Muscle	2											
Neuroblastoma						2						
Oral	1											
Placenta	2											
Seminoma		1										
Skin	1											
Tongue		1										
Vulva						1						

Figura 1.29: Espressione di Clusterina in tumori primari. Espressione dell'mRNA di CLU in esperimenti "Affimatrix" come rappresentata sul sito web Oncomine. L'ombreggiatura blu si riferisce alla sotto-espressione del trascritto mentre quella rossa alla sua over-espressione. L'intensità dei colori è proporzionale alla significatività statistica della differenza. I numeri indicano quanti esperimenti indipendenti mostrano differenza significativa in ciascun tessuto. È da notare che nella colonna "Cancer vs Normal" (rettangolo verde) tutti i tessuti trasformati, ad eccezione del cervello, mostrano una significativa down-regolazione di CLU rispetto alla controparte normale di controllo (tratto da Sala *et al.*, 2009).

L'espressione della proteina CLU è stata trovata down-regolata nel tumore del pancreas (Xie *et al.*, 2002), nel neuroblastoma (Santilli *et al.*, 2003), nel cancro della pelle (Thomas-Tikhonenko *et al.*, 2004) e dell'esofago (Zhang *et al.*, 2003), mentre è stata trovata up-regolata nel tumore della mammella (Redondo *et al.*, 2000). Per quanto riguarda il neuroblastoma, osservazioni recenti riportano l'ipotesi che CLU sia un gene oncosoppressore. In particolare è stato verificato che la sovraespressione di CLU in cellule di neuroblastoma è in grado di ridurre significativamente la motilità e l'invasività, riducendo l'attività di NF- κ B, attraverso una stabilizzazione di I κ B α ed I κ B β . È pertanto stato suggerito che il livello di espressione pressoché nullo di CLU in neuroblastoma sia correlato all'aumento della proliferazione cellulare, e all'acquisizione della chemoresistenza e sia associato alla progressione tumorale verso un fenotipo metastatico particolarmente aggressivo. (Santilli *et al.*, 2003). Inoltre in tale tumore è stata osservata la presenza di una forma di CLU a localizzazione nucleare solo in cellule morenti all'interno di aree apoptotiche o tessuti necrotici (Chayka *et al.*, 2009).

Discordanti sono i dati sull'espressione di CLU nel tumore del colon. Alcuni autori (Chen *et al.*, 2004) trovano che sia il messaggero della CLU, sia la proteina siano sottoespressi in campioni di adenocarcinoma del colon rispetto a campioni di tessuto benigno prelevati dallo stesso paziente (figura 1.30).

Gli stessi autori evidenziano come l'induzione di apoptosi mediante trattamento con chemioterapici, si accompagna alla sovraespressione di CLU ed alla sua localizzazione nel nucleo delle cellule tumorali. Tale induzione di apoptosi richiede l'espressione della proteina pro-apoptotica p21, mentre è indipendente da p53. La sovraespressione di CLU in cellule p21 nulle è in grado di restaurare la sensibilità al chemioterapico e la risposta apoptotica, pertanto è stato proposto che

Introduzione

CLU agirebbe a valle di p21 nell'induzione di apoptosi in cellule di colon trasformate.

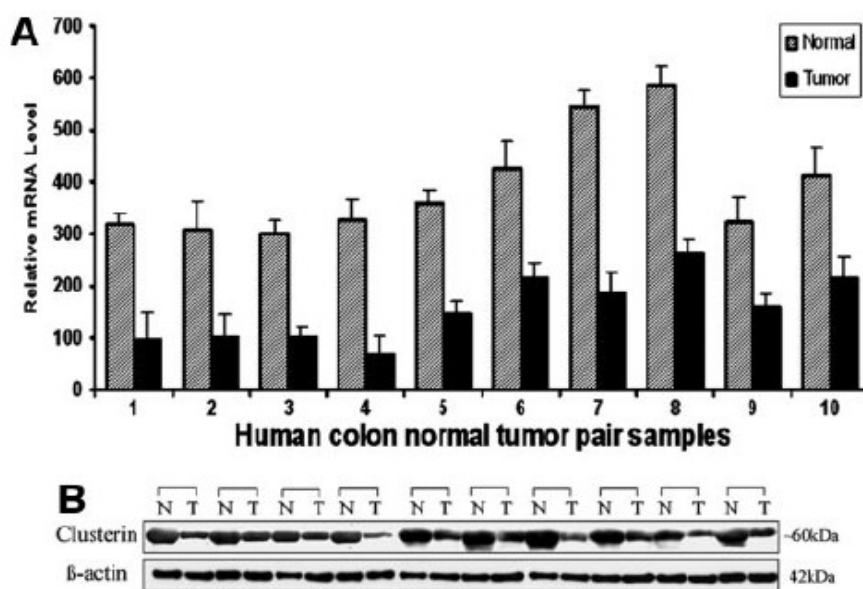


Figura 1.30: Down-regolazione di CLU nel tumore del colon. Livelli di espressione del messaggero di CLU, misurato mediante RT-PCR (**A**) e della proteina misurata mediante Western blot (**B**) in campioni di tumore del colon e di tessuto benigno prelevati dallo stesso paziente. N=Tessuto normale; T= Tessuto tumorale (da Chen *et al.*, 2004).

Al contrario, un altro studio, indica una correlazione fra la progressione del tumore del colon e l'aumento della forma di secrezione di CLU e la scomparsa della forma nucleare (Pucci *et al.*, 2004), suggerendo che le due isoforme svolgerebbero ruoli opposti nella tumorigenesi. Un recente lavoro (Andersen *et al.*, 2007), evidenzia come l'espressione di CLU nelle cellule epiteliali del colon sia praticamente trascurabile, tanto in tessuti normali, quanto in quelli tumorali, e come vi sia invece una forte espressione della proteina nel tessuto stromale normale che invece risulta ridotta quando la malattia progredisce a spese del tessuto stromale. Pertanto, nel complesso, l'espressione di CLU, verificata mediante

analisi Western-blot, in campioni tumorali, risulta ridotta rispetto al tessuto sano prelevato dallo stesso paziente.

Anche nel caso del tumore della prostata sono stati pubblicati dati contrastanti sulla correlazione fra espressione di CLU e progressione della patologia neoplastica. I dati prodotti nel nostro laboratorio su campioni di tessuto prostatico sano e tumorale, prelevati da prostate di pazienti sottoposti ad interventi di prostatectomia radicale, indicano che il messaggero della CLU è down-regolato nel tumore già nelle prime fasi di sviluppo e progressione della malattia (Bettuzzi *et al.*, 2000). La progressione del tumore prostatico si accompagna, oltre alla down-regolazione di CLU, alla variazione nel livello di espressione di altri 7 geni. Il gruppo di 8 geni da noi identificati, la cui espressione risulta modulata nell'adenocarcinoma prostatico, costituisce una "*gene signature*", che ha consentito di predire e diagnosticare con una accuratezza del 95% la ricorrenza di malattia in pazienti affetti da carcinoma prostatico organo-confinato e sottoposti ad intervento di prostatectomia radicale (Bettuzzi *et al.*, 2003; Rizzi *et al.*, 2008).

Abbiamo inoltre evidenziato che, in accordo con quanto osservato da Andersen *et al.* nel tumore del colon, l'espressione di CLU nei campioni di tumore prostatico è prevalentemente confinata al compartimento stromale, mentre l'espressione nelle cellule epiteliali trasformate è solamente occasionale. La localizzazione intracellulare della proteina, nelle rare cellule tumorali che risultano positive alla marcatura, è sempre confinata al comparto citoplasmatico (Scaltriti *et al.*, 2004c; figure 1.31, tabella 1.3).

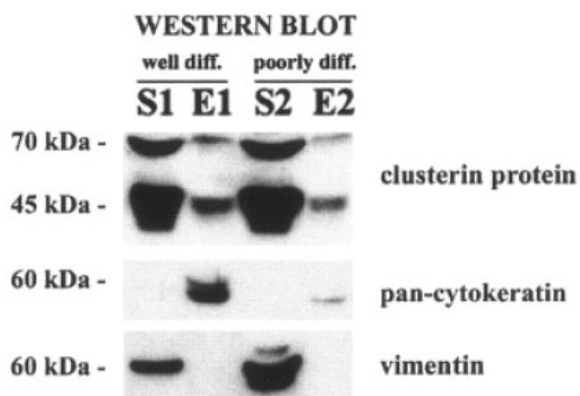


Figura 1.31: Espressione di CLU nel carcinoma prostatico.

Espressione di CLU in colture primarie di cellule prostatiche epiteliali (E) e stromali (S) derivate da un campione di tessuto tumorale ben differenziato, (S1 ed E1) o indifferenziato (S2 ed E2). CLU è maggiormente espressa nel comparto stromale, mentre l'espressione nelle cellule epiteliali, già debole, viene progressivamente persa nel corso dell'evoluzione della malattia. Vimentina e pan-citocheratine sono state impiegate rispettivamente come marcatori selettivi delle frazioni stromale ed epiteliale (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004c).

Tipo tessuto	N° campioni	GS	Marcatura stroma	Intensità della marcatura	Marcatura epitelio	Intensità della marcatura
Benigno	25	-----	20	+	6	+/-
CaP ben differenziato	5	2-4	5	+	0	-
CaP mod. differenziato	11	5-6	9	+ / ++	0	-
CaP poco differenziato	9	7-10	8	+++	0	-

Tabella 1.3: Espressione di CLU in campioni di tessuto prostatico congelato, sano e tumorale, verificata mediante analisi immuno-istochimica. Intensità della marcatura: -, Assenza di marcatura; +/-, Marcatura occasionale; +, Debole marcatura; ++, Marcatura moderata; +++, Marcatura intensa. CaP= cancro prostatico. GS= Gleason Score. (tratto da Scaltriti *et al.*, 2004b).

Riteniamo pertanto che l'espressione di CLU nel tessuto stromale peritumorale sia associata a fenomeni di atrofia e rimodellamento dello stesso dovuti alla progressione della neoplasia, mentre le rare cellule epiteliali, positive alla marcatura, possano costituire una sub-popolazione cellulare in grado di tollerare alti livelli d'espressione di

CLU citoplasmatica. Queste cellule potrebbero essere resistenti all'apoptosi indotta dai farmaci androgeno bloccanti. In questo modo potrebbero essere spiegati i dati contrastanti che indicano una up-regolazione della CLU in tumori prostatici refrattari alla terapia anti-androgenica (July *et al.*, 2002). In pratica nell'impiego a lungo termine di terapie androgeno-bloccanti, la maggior parte delle cellule tumorali, capaci di esprimere la forma nucleare della CLU morirebbero, e verrebbe invece selezionata una popolazione di cellule resistenti all'apoptosi in grado di esprimere solo la forma citoplasmatica di CLU. Il clone cellulare così selezionato sarebbe responsabile della progressione della malattia verso il fenotipo androgeno-indipendente e metastatico.

È dunque CLU un regolatore positivo o negativo della tumorigenesi nei mammiferi? Bettuzzi e colleghi in un lavoro del 2009 hanno aiutato a chiarire questa fondamentale questione studiando il ruolo di CLU nella tumorigenesi del carcinoma prostatico *in vivo*, mediante l'incrocio di topi CLU knock-out (CluKO) con topi TRAMP (Bettuzzi *et al.*, 2009). I topi TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate) sono il modello trasgenico murino di adenocarcinoma prostatico. In questo sistema l'espressione degli antigeni T/t di SV40 (un virus oncogenico) si trova sotto il controllo del promotore della probasina di ratto e la sua attività è dipendente dal livello di androgeni circolanti. Gli antigeni virali causano l'abrogazione della funzione di p53 e pRb e l'inibizione dell'attività di PP2A (proteina fosfatasi 2A), causando la perdita di controllo del ciclo cellulare e quindi della proliferazione cellulare. Nei topi TRAMP lo sviluppo del cancro alla prostata è correlato all'età e mima l'intero spettro di progressione del carcinoma prostatico umano, dalla neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN) alla malattia androgeno-indipendente. I topi trasgenici maschi sviluppano, a partire dalla 12^a settimana e nel 100% dei casi, microscopiche lesioni tumorali (evidenti solo all'esame

Introduzione

istologico), che evolvono nel carcinoma invasivo prima ben differenziato e poi indifferenziato (con formazione di tumori palpabili) fino alle metastasi che si evidenziano nella maggior parte degli animali a partire dalla 24^a settimana di vita (Greenberg *et al.*, 1995; Gingrich *et al.*, 1999; Kaplan-Lefko *et al.*, 2003). Mentre per quel che riguarda i topi CluKO, in cui uno o entrambi gli alleli di CLU sono geneticamente inattivati, si è ritenuto inizialmente che non manifestassero nessun evidente difetto macroscopico eccetto se non una maggior tendenza a sviluppare problemi di autoimmunità a livello cardiaco (McLaughlin *et al.*, 2000) e una maggiore propensione alla tumorigenesi di melanomi, chimicamente indotta, rispetto a topi normali (Thomas-Tikhonenko *et al.*, 2004). Inaspettatamente, invece, Bettuzzi *et al.* hanno riscontrato una trasformazione dell'epitelio prostatico nella maggior parte dei topi CluKO analizzati. In particolare, alla quarantesima settimana di età, è stata osservata la presenza di PIN, sia precoce che di grado severo, in cinque topi CluKO (+/-) su otto ed in sei topi CluKO (-/-) su nove. Inoltre è stato evidenziato lo sviluppo di un cancro prostatico ben differenziato in due degli otto CluKO (+/-) e in tre dei nove CluKO (-/-), mentre nella controparte wild-type non è stata osservata nessuna lesione tumorale. In topi TRAMP incrociati con CluKO, sia in caso di delezione parziale che totale del gene *Clu*, la diffusione tumorale è risultata notevolmente aumentata e la presenza di metastasi in siti ectopici è stata riscontrata precocemente rispetto a quanto accade normalmente in topi TRAMP (tabella 1.4) (figura 1.32, a e b).

Tabella 1.4: Analisi quantitativa delle lesioni prostatiche in topi TRAMP, CluKO e TRAMP/CluKO (modificato da Bettuzzi *et al*, 2009).

	Wild-type	TRAMP	CluKO (+/-)	CluKO (-/-)	TRAMP/CluKO (+/-)	TRAMP/CluKO (-/-)
Necropsia a 40 settimane	PIN:1/9 Tumori:0/9	Tumori:9/9	PIN:5/8 ^a Tumori:2/8 ^a	PIN:6/9 ^b Tumori:3/9 ^b	Tumori:9/9	Tumori:9/9
Metastasi a 24 settimane	0	0	0	0	3/9	3/9
Diffusione metastatica	no	1	no	no	9	9

^a*P*=0.004 test esatto di Fisher a due code rispetto al controllo wild-type (PIN+Tumori)

^b*P*=0.00004 test esatto di Fisher a due code rispetto al controllo wild-type (PIN+Tumori)

La sopravvivenza a 28 settimane d'età riscontrata in TRAMP, TRAMP/CluKO(+/-) e TRAMP/CluKO(-/-) è stata del 100, 83 e 70% rispettivamente; mentre successivamente, passati i 200 giorni di età, la curva di sopravvivenza dei diversi tipi di topi trasgenici inizia ad essere paragonabile (figura 1.32, c). Inoltre, l'8% delle femmine TRAMP/CluKO(-/-) (cinque animali su 60) ha sviluppato tumori localizzati principalmente alla tiroide e all'utero, ma anche a livello linfonodale e polmonare. La tumorigenesi in femmine TRAMP non è mai stata riportata in letteratura ed in questo studio non è stata osservata in femmine con entrambi gli alleli wild-type di CLU.

In questo lavoro è stata valutata anche l'espressione del marker di proliferazione Ki67, i cui livelli risultano alti nella porzione normale non trasformata del tessuto prostatico, in topi sia omo che eterozigoti per la delezione di CLU; mentre solo pochi nuclei reattivi alla colorazione sono stati individuati nelle prostate provenienti dai topi di controlli wild-type. Infatti la quantificazione della marcatura di Ki67 nel tessuto prostatico normale di topi CluKO mostra un indice di proliferazione notevolmente elevato rispetto a quello determinato nei controlli wild-type (figura 1.33).

Introduzione

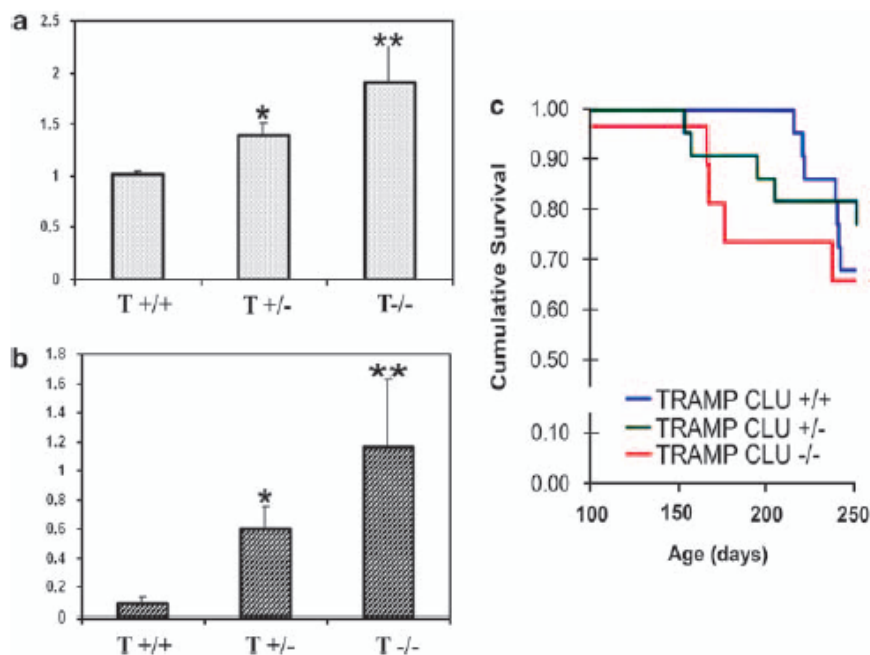


Figura 1.32: Tumorigenesi, diffusione metastatica e sopravvivenza in topi TRAMP/CluKO.

Quantificazione della formazione di tumori primari **(a)** e metastasi **(b)** in topi TRAMP con diversi genotipi di *Clu*. Il numero medio di tumori primari/metastasi per animale è indicato sull'asse delle y; le barre rappresentano la deviazione standard; analisi statistica ANOVA *P=0.05, **P=0.01. **(c)** Analisi Kaplan-Meier della sopravvivenza in topi TRAMP con diversi genotipi di *Clu*. Il test log-rank indica una differenza significativa fino a 200 giorni dalla nascita (TRAMP wild-type (+/+) vs TRAMP/CluKO(-/-) P=0.006, TRAMP wild-type (+/+) vs TRAMP/CluKO(+/-) P=0.038). Passati i 200 giorni di età la differenza perde di significatività e le curve iniziano a sovrapporsi.

Numero di topi per ogni genotipo di *Clu*: TRAMP wild-type (+/+)=43, TRAMP/CluKO(+/-)=20, TRAMP/CluKO(-/-)=12.

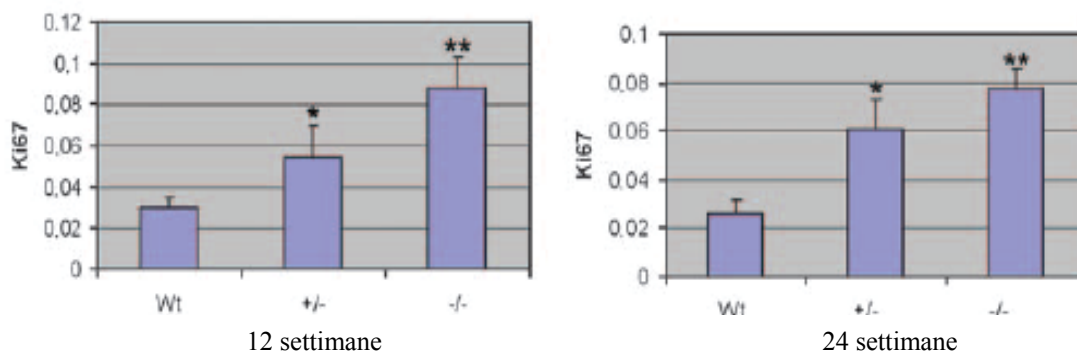


Figura 1.33: Quantificazione della marcatura di Ki67 in topi CluKO alla 12^a e alla 24^a settimane d'età.

L'indice di proliferazione è indicato sull'asse delle y; le barre rappresentano la deviazione standard; gli asterischi indicano P=0.05 (*), P=0.01 (**) rispetto al controllo wild-type (one way analysis of variance, ANOVA).

Nei topi TRAMP è stato rilevato un forte segnale di Ki67 soprattutto a livello delle lesioni cancerose mentre, nelle prostate di incroci TRAMP/CluKO, questo è diffuso anche alle porzioni di prostata non trasformate. È stato infatti osservato una porzione di cellule Ki67-positivo derivanti dallo strato cellulare basale, il quale invece mostra l'aspetto tipico di cellule luminali normali e completamente differenziate, negative per Ki67. In questo studio è stata valutata anche l'espressione di NF- κ B, un fattore di trascrizione che regola geni coinvolti nella proliferazione/sopravvivenza cellulare, che precedentemente Shukla *et al.* hanno dimostrato essere overespresso in topi TRAMP a livello di PIN e/o lesioni tumorali (Shukla *et al.*, 2005). Dato confermato da Bettuzzi e colleghi che hanno rilevato in topi TRAMP una marcatura positiva per ki67 a livello delle lesioni tumorali, pressoché nulla invece nel tessuto prostatico normale non trasformato adiacente. Inoltre in topi TRAMP/CluKO(-/-) è stata riscontrata una marcatura di NF- κ B a livello delle lesioni neoplastiche ancora più intensa. Da questi studi condotti sui topi TRAMP/CluKO è stato possibile dedurre come CLU possa limitare la tumorigenesi e la diffusione metastatica, regolando l'attività di NF- κ B. Per contro, in letteratura, è stato descritto un meccanismo pro-apoptotico sotto il controllo di NF- κ B, coinvolto nella replicazione stress-indotta dall'utilizzo di farmaci chemioterapici, in base al quale è stato ipotizzato che cellule maligne, incluse quelle di carcinoma prostatico, potrebbero riattivare l'espressione di CLU per sopprimere la funzione di NF- κ B e sopravvivere (Wu e Miyamoto, 2008). Esistono tuttavia alcune limitazioni a questa ipotesi che è bene sottolineare. In primo luogo, sebbene la perdita di CLU induca la formazione di lesioni iperproliferative o, in alcuni casi, trasformazione dell'epitelio prostatico, non è mai stata rilevata una progressione in malattia metastatica in assenza di stimoli oncogenici come l'espressione del transgene di SV40; ed infatti la vita dei topi CluKO ha la stessa

Introduzione

durata di quella degli animali di controllo. Inoltre, sebbene i topi TRAMP siano ampiamente utilizzati come modello di cancro alla prostata umano metastatico, studi recenti hanno rivelato come esistano componenti neuroendocrine che complicano l'interpretazione dei risultati in tale modello (Chiaverotti et al., 2008). Tuttavia è possibile concludere dicendo che CLU è un soppressore della tumorigenesi prostatica in topo e la sua espressione è notevolmente diminuita in pazienti umani affetti da carcinoma alla prostata. Tutto questo non è incompatibile con l'ipotesi che, in un limitato numero di casi, la riattivazione dell'espressione di CLU possa comportare un incremento della resistenza a farmaci chemioterapici con conseguente progressione della malattia.

1.4 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI CLUSTERINA

1.4.1 Regolazione di Clusterina da parte di oncogeni trasformanti: prime evidenze sperimentali

La prima evidenza di una modulazione dell'espressione di Clusterina durante la trasformazione tumorale risale al 1989 quando Michel e colleghi riportarono che un gene, successivamente identificato come omologo a CLU, inducibile termicamente era attivato in cellule di quaglia da oncogeni retrovirali con attività chinasi come v-src, v-fps e v-mil (Michel *et al.*, 1989). Successivi esperimenti rivelarono che l'induzione da parte di queste chinasi dipendeva dal sito di legame per AP-1 presente in prossimità del sito d'inizio trascrizione di CLU. Un risultato simile fu ottenuto da Herault *et al.* nel 1992 in cellule neuroretinali di quaglia infettate col virus del sarcoma di Rous (Herault *et al.*, 1992). Il ruolo di AP-1 (un complesso contenente le oncoproteine Jun e Fos) nella regolazione dell'espressione di Clusterina è stato confermato successivamente in altri contesti. Per esempio è stato dimostrato che TGF- β , nei mammiferi, è in grado di modulare positivamente l'espressione di CLU attraverso l'attivazione del sito AP-1 (Jin e Howe, 1999). In questo lavoro gli autori propongono che il meccanismo di attivazione consista nella trans-repressione di c-Fos da parte di TGF- β . Un altro studio ha mostrato come l'esposizione della linea cellulare di cheratinociti HaCat al vanadio induca apoptosi, espressione di c-Fos ed uno spostamento nella produzione di CLU dalla forma secreta a quella nucleare (Markopoulou *et al.*, 2009). Gli autori hanno ipotizzato che c-Fos possa controllare il rapporto fra la frazione citoplasmatica e nucleare di CLU.

Il gruppo di ricerca di Claudia Koch-Brandt è stato il primo a studiare il ruolo svolto da due classici protooncogeni, c-MYC e H-RAS, nella regolazione dell'espressione di Clusterina (Klock *et al.*, 1998). Gli autori riportarono che, nella linea cellulare di fibroblasti fetali di ratto Rat-1, l'over-espressione di H-Ras, ma non di c-MYC, è in grado di reprimere la trascrizione di CLU. Il meccanismo alla base di questo fenomeno è stato chiarito in seguito e sarà discusso più avanti.

1.4.2 Regolazione di Clusterina da parte di fattori di trascrizione proto-oncogenici

- **c-MYC**

MYC è una piccola famiglia di fattori di trascrizione composta dal membro prototipo c-MYC, da MYCN (neuronale specifico) e dal meno studiato L-MYC.

c-MYC è il fattore di trascrizione che riveste uno dei ruoli più importanti nella tumorigenesi umana (Lutz *et al.*, 2002; Vita e Henriksson, 2006; Yaylim-Eraltan *et al.*, 2008). Nonostante inizialmente si pensasse che c-MYC non fosse coinvolto nella regolazione dell'espressione di CLU (Klock *et al.*, 1998), nel 2004 il gruppo di ricerca guidato da Thomas-Tikhonenko dimostrò che livelli ectopici di questo fattore di trascrizione sono in grado di reprimere fortemente CLU sia in colonociti murini che in cheratinociti umani. Una delle osservazioni più interessanti emerse da questo lavoro risiede nel fatto che una forzata over-espressione di CLU possa, almeno in parte, inibire la tumorigenesi dipendente da c-MYC. Infatti, CLU è in grado di attenuare la proliferazione di colonociti trasformati da c-MYC, e topi Knock-out per il gene della Clusterina sono maggiormente inclini a sviluppare papillomi in seguito all'esposizione ad agenti cancerogeni (Thomas-Tikhonenko *et al.*, 2004).

Anche MYCN si comporta come un regolatore negativo di CLU. Nel neuroblastoma, tumore pediatrico nel quale l'espressione di CLU è stata recentemente dimostrata essere down-regolata (Chayka *et al.*, 2009), è presente un'amplificazione di MYCN, la quale, da sola, è sufficiente ad indurre la trasformazione di cellule embrionali del sistema simpatico in neuroblastomi maligni. In tumori dove MYCN è amplificato, CLU è fortemente down-regolata e sembra che MYCN sia, almeno in parte, responsabile di questo fenomeno attraverso l'induzione trascrizionale del cluster miR-17-92 composto da un gruppo di 6 microRNA (Dews *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2005).

- **MYB**

MYB, in modo simile a MYC, è una famiglia di fattori di trascrizione che include le proteine tessuto specifiche C-MYB e A-MYB e il fattore ubiquitario B-MYB, un regolatore positivo di proliferazione e sopravvivenza cellulare (Lipsick *et al.*, 2001; Oh e Reddy, 1999, Sala e Watson, 1999). Il fatto che B-MYB sia sovraespresso e/o amplificato in vari tipi di tumori umani lo rende un candidato ideale come protooncogene (Nakajima *et al.*, 2008; Raschella *et al.*, 1999; Sala e Watson, 1999). Sala e collaboratori hanno dimostrato che B-MYB si lega ad una sequenza consenso sul promotore di CLU regolandolo positivamente e che CLU è in grado di mediare, almeno in parte, l'effetto antiapoptotico di B-MYB. L'induzione di CLU mediata da B-MYB può conferire resistenza alla doxorubicina alle cellule di neuroblastoma umano LAN5 conducendole alla morte (Cervellara *et al.*, 2000). Inoltre lo stress termico è più pronunciato in fibroblasti trasfettati con un costrutto che esprime B-MYB in modo dominante negativo, il quale a sua volta attenua l'induzione termica di CLU (Santilli *et al.*, 2005). Questi risultati sono in accordo con l'evidenza di una correlazione fra la diminuzione dell'espressione di sCLU e B-

MYB e la morte per apoptosi indotta dagli acidi trans-retinoici in cellule di muscolo liscio (Orlandi *et al.*, 2005).

- **NF- κ B**

NF- κ B è un fattore di trascrizione multifunzionale che ha un ruolo centrale nell'immunità e nel cancro. NF- κ B è attivato in risposta a stimoli esterni come il legame fra il recettore di TNF- α ed il suo ligando, e dalle chinasi IKK- α , - β e - γ , le quali fosforilando gli inibitori di κ B (I κ Bs), liberano la forma trascrizionalmente attiva di NF- κ B (Gilmore, 2006; Perkins, 2007). La prima testimonianza di un coinvolgimento di NF- κ B nella regolazione di CLU è stata fornita da Kenneth e collaboratori. Nel loro lavoro, gli autori hanno effettuato un'analisi sistematica in fibroblasti embrionali murini al fine di isolare tutti i geni target di NF- κ B, utilizzando un inibitore molecolare di NF- κ B, in presenza o assenza di TNF- α , il suo induttore classico. Fra gli innumerevoli geni identificati come attivati da NF- κ B, CLU è uno dei maggiormente regolati (Li *et al.*, 2002). Inoltre, è molto interessante notare che il knock-out di anche solo uno dei tre IKK conduce alla mancata attivazione di CLU, suggerendo la dipendenza di questa dall'intero pathway di segnalazione di NF- κ B. Questi risultati sono poi stati confermati in un secondo momento da un altro gruppo di ricerca che ha dimostrato che CLU può essere indotta in astrociti e cellule gliali dal liposaccaride batterico LPS, un noto attivatore di NF- κ B (Saura *et al.*, 2003) e come l'utilizzo di aspirina o MG132, che indirettamente inibiscono NF- κ B, comporti un'inibizione dell'espressione di CLU. Inoltre è stato successivamente dimostrato che CLU è in grado di regolare negativamente NF- κ B stabilizzandone gli inibitori I κ B (Devauchelle *et al.*, 2006; Santilli *et al.*, 2003; Savkovic *et al.*, 2007; Takase *et al.*, 2008a,b). Tutto ciò porta ad ipotizzare che CLU partecipi ad un circuito di regolazione negativa in cui l'attivazione trascrizionale di CLU sia evocata per diminuire

l'attività di NF- κ B. Questa ipotesi è supportata da un lavoro in cui è stato dimostrato che livelli atipicamente bassi di CLU causano un'eccessiva attivazione di NF- κ B ed una secrezione patologica di citochine nell'artrite reumatoide (Devauchelle *et al.*, 2006).

- **Egr1**

Il gruppo guidato da Boothman fu il primo a mostrare come le radiazioni ionizzanti inducessero la produzione sCLU (Yang *et al.*, 2000). Successivamente, lo stesso gruppo ha rilevato che tale irraggiamento conduceva all'attivazione di un pathway di segnalazione a partire dai recettori di due fattori di crescita: EGFR e IGFR. È stato dimostrato che IGFR, ma non EGFR, è in grado di mediare l'induzione di sCLU in risposta all'irraggiamento (Criswell *et al.*, 2005). È da notare che la cascata di chinasi Src/Map innescata da IGFR termina con l'attivazione del fattore di trascrizione Egr1, il quale, a sua volta, si lega al promotore di CLU inducendone l'espressione. In questo contesto l'induzione di sCLU sembra rivestire un ruolo citoprotettivo, in quanto un suo knock-down, ottenuto mediante RNA interference, accelera invece la morte cellulare.

- **Stat1**

STAT è un gruppo di fattori di trascrizione implicati nella trasduzione di segnali di sopravvivenza o apoptosi a valle di una classe di molecole associate a recettori chiamate "JAKs". In uno screening Affymetrix condotta al fine di trovare geni coinvolti nella resistenza al farmaco docetaxel, Djeu e colleghi hanno identificato CLU e Stat-1 come geni inducibili da questo chemioterapico in grado di inibire l'apoptosi da esso indotta. In questo fenomeno Stat-1 sembra essere temporalmente collocata a monte di CLU in quanto una sua deplezione tramite siRNA comporta una riduzione del 50% dell'espressione di CLU in cellule di cancro prostatico (Patterson *et al.*,

2006). Non è chiaro se Stat-1 intervenga direttamente nella regolazione dell'espressione di CLU, ma la presenza a livello della regione promotore di CLU di un sito di legame per Stat-1 sembra avvalorare questa ipotesi.

1.4.3 Regolazione epigenetica di Clusterina: stato dell'arte

L'epigenetica è una branca della biologia molecolare, relativamente nuova ed in continua evoluzione, che studia la trasmissione di caratteri ereditari in grado di influenzare il fenotipo e/o l'espressione genica di un organismo senza modificare però direttamente la sequenza del DNA a livello genomico. La regolazione epigenetica modula per esempio l'accessibilità alla cromatina, e quindi ai geni in essa contenuti, attraverso principalmente due meccanismi: la metilazione del DNA e la modificazione post-traduzionale delle code istoniche che formano il nucleosoma, l'unità fondamentale della cromatina. È noto che la metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni H3 e H4 mantengono la cromatina in uno stato compatto e quindi non accessibile ai macchinari trascrizionali mentre l'acetilazione selettiva degli istoni H1, H3, H4; la metilazione di particolari residui di lisina degli istoni H3 e H4 e il DNA non metilato si associano alla cromatina attivamente trascritta. Nei mammiferi questo tipo di regolazione è fondamentale per il controllo dell'espressione genica ed è alla base di diversi ed importanti processi biologici come l'imprinting genomico, il controllo dello sviluppo embrionale e l'inattivazione del cromosoma X (Reik e Walter, 2001; Reik *et al.*, 2001; Avner e Heard, 2001). Inoltre questi meccanismi giocano un ruolo rilevante nella tumorigenesi, in quanto determinate modificazione istoniche e/o ipermetilazioni aberranti a livello di regioni promotore comportano il silenziamento trascrizionale di geni oncosoppressori (Herman e Baylin, 2003). Nei tumori infatti, il DNA è

spesso globalmente ipometilato, ma localmente ipermetilato nelle regioni promotrici ricche in CpG di geni oncosoppressori come ad esempio p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p14^{ARF}, p73, APC (Adenomatous Polyposis Coli) o BRCA1 (BRCA1 (Breast Cancer type 1 susceptibility protein) (Esteller *et al.*, 2001; Esteller, 2003). Inibitori delle DNA metiltrasferasi (DNMT) e delle istone deacetilasi (HDAC) possono agire sinergicamente e riattivare geni oncosoppressori epigeneticamente silenziati, arrestando la proliferazione di cellule tumorali ed inducendone morte (Cameron *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2006). Strategie basate su microarray, che permettono il confronto fra lo stato basale di espressione genica con quello modificato in seguito al trattamento delle stesse cellule con farmaci epigenetici, si sono dimostrate strumenti potenti nell'identificazione di nuovi geni oncosoppressori silenziati nei tumori umani (Suzuki *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2002). In diversi di questi studi *CLU* è stato identificato come uno dei geni maggiormente de-repressi in seguito al trattamento con questo tipo di inibitori, in particolar modo in linee cellulari di cancro prostatico (Lodygin *et al.*, 2005; Rauhala *et al.*, 2008), in linee di fibroblasti di ratto trasformati con HRAS (Lund *et al.*, 2006) ed in cellule endoteliali tumorali (Hellebrekers *et al.*, 2007). Rauhala e colleghi hanno trattato con 5-aza-2'-deossicitidina (5AzadC) e tricostatina A (TSA), inibitori rispettivamente di DNMT e HDAC, la linea cellulare TRAMP-C2 (derivata dal modello transgenico murino di tumore prostatico umano, TRAMP) e successivamente valutato le modificazioni epigenetiche indotte da questi composti a livello di espressione genica tramite microarray. Fra i 43 geni individuati mediante questa analisi come potenzialmente silenziati per via epigenetica, *CLU* è stata scelta per studi più approfonditi in quanto la sua espressione, significativamente più bassa in TRAMP-C2 rispetto a cellule di prostata murina normale, è fortemente upregolata in seguito al trattamento con 5AzadC e TSA. Sono state quindi

Introduzione

analizzate mediante "bisulphite sequencing" due isole CpG identificate nel promotore murino di *CLU*. La prima isola, localizzata nella zona circostante il sito di inizio trascrizione, è risultata non metilata mentre la seconda, posizionata circa 400 bp più a valle, possiede una percentuale di metilazione del 64%. Gli autori hanno ottenuto risultati simili in cellule LNCaP di cancro umano, dimostrando quindi che la down-regolazione di *CLU* in questi due tipi cellulari tumorali è dovuta ad un'ipermetilazione del promotore (Rauhala *et al.*, 2008).

Utilizzando una procedura simile, Hellebrekers e colleghi hanno identificato 81 geni down-regolati in cellule endoteliali cresciute in mezzo condizionato da fattori tumorali rispetto alle stesse mantenute in stato quiescente, e riattivati da 5AzadC e TSA. Anche in questo caso, *CLU* è risultato essere il gene che maggiormente possedeva queste caratteristiche. È stato poi dimostrato mediante bisulphite sequencing e saggi di ChIP che, in questo particolare tipo cellulare, il silenziamento di *CLU* sia dovuto in un primo momento alla deacetilazione di H3 e alla perdita di metilazione sulla lisina 4 di questo istone, senza però un coinvolgimento immediato dello stato di metilazione delle CpG Island. Gli autori ipotizzano che l'ipermetilazione diretta del promotore di *CLU* subentri a tempi lunghi, rendendo il silenziamento irreversibile. Inoltre, Hellebrekers e collaboratori hanno verificato che il silenziamento di *CLU*, mediante trasfezione con shRNA, è in grado di aumentare la proliferazione, la migrazione, e lo "sprouting" delle cellule endoteliali umane, suggerendo pertanto per questo gene una funzione di regolazione negativa della neo-angiogenesi tumorale (Hellebrekers *et al.*, 2007).

Un tale meccanismo di regolazione epigenetica di *CLU* era stato già precedentemente ipotizzato in fibroblasti di ratto trasformati con l'oncogene HRAS dal gruppo di Lund e colleghi. Gli autori infatti hanno proposto che in ratto la soppressione dell'espressione di *CLU*, in seguito all'induzione di RAS, sia mediata in tempi precoci

dall'ipoacetilazione dell'istone H3 e solo a tempi più lunghi dall'ipermetilazione del promotore del gene (Lund *et al.*, 2006).

In letteratura altri articoli riportano una regolazione di CLU di tipo epigenetico in particolare in cellule umane neuronali e di epitelio pigmentato della retina (Suuronen *et al.*, 2007; Nuutinen *et al.*, 2005). In questi lavori è stato osservato che il trattamento con 5AzadC e TSA è in grado di indurre un notevole aumento dell'espressione del messaggero di CLU e della produzione e secrezione della proteina corrispondente. Gli autori hanno inoltre dimostrato che la derepressione di CLU avviene a livello trascrizionale perché questa risulta completamente bloccata in presenza di actinomomicina D, un inibitore della RNA polimerasi II.

Capitolo 2: SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi è stato progettato al fine di:

- a) investigare la distribuzione in diverse linee cellulari umane delle due isoforme trascrizionali di *CLU*, verificando così anche l'eventuale esistenza del messaggero alternativo proposto da Leskov;
- b) analizzare "*in silico*" la presenza di regioni promotrici per il gene *CLU*;
- c) determinare le variazioni indotte sull'espressione di *CLU* dal trattamento di linee cellulari di cancro prostatico con i farmaci epigenetici tricostatina A (TSA), un inibitore delle istone deacetilasi (HDAC) e/o 5-aza-2'-deossicitidina (5AzadC), un inibitore delle DNA metiltransferasi (DNMT); analizzare lo stato di metilazione delle isole CpG presenti all'interno della regione genomica di *CLU*, il livello di espressione delle due isoforme trascrizionali, e la produzione delle forme proteiche di *CLU* e la loro localizzazione cellulare;
- d) valutare la presenza di meccanismi epigenetici coinvolti nella regolazione dell'espressione *CLU*.

Capitolo 3: MATERIALI E METODI

3.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DELLE ISOFORME TRASCRIZIONALI DI CLU IN LINEE CELLULARI UMANE NORMALI, IMMORTALIZZATE E TUMORALI

L'espressione relativa delle due varianti trascrizionali di CLU, e la presenza del messaggero alternativo proposto da Leskov *et al.* nel 2003, sono state valutate tramite RT-PCR in tutte le linee cellulari sotto riportate, cresciute in condizioni standard.

3.1.1 Caratteristiche delle linee cellulari umane utilizzate

- **WI38:** linea cellulare diploide derivata da tessuto polmonare normale ottenuto da un feto abortito di circa tre mesi di gestazione (Hayflick e Moorhead, 1961). Queste cellule hanno una vita finita corrispondente a 50 più o meno dieci passaggi con un tempo di duplicazione di 24 ore (Hayflick, 1965). La linea cellulare WI38 possiede una morfologia fibroblastoide ed aderisce al substrato di crescita.
- **HTB125:** linea cellulare diploide isolata da Hackett *et al.* nel 1977 da tessuto mammario normale periferico ad un adenocarcinoma infiltrante dal quale ebbe poi origine la linea cellulare HTB126. Le cellule HTB125 mostrano una morfologia fibroblasto-simile ed in origine probabilmente erano mioepiteliali in quanto possiedono microfilamenti e cluster di vescicole pinocitotiche simili a quelle osservabili nel mioepitelio in vivo. Questa linea cellulare può raggiungere circa 22 duplicazioni prima di andare in senescenza.
- **BEAS2B:** linea cellulare isolata da epitelio bronchiale normale ottenuto dall'autopsia di un individuo sano, ed immortalizzata tramite infezione con ibrido adenovirus 12-SV40 (Reddel *et al.*, 1989). Le BEAS2B mantengono l'abilità di differenziarsi in cellule squamose in

Materiali e metodi

risposta all'aggiunta di siero e possono essere utilizzate per vagliare la capacità di agenti chimici e biologici di indurre o influire sulla differenziazione e/o la carcinogenesi. Questa linea cellulare risponde positivamente alla colorazione per le cheratine e per l'antigene T di SV40.

- **PNT1A:** Linea di cellule epiteliali prostatiche umane normali immortalizzate mediante trasfezione stabile con l'antigene T del virus SV-40 (Cussenot *et al.*, 1991). Queste cellule sono androgeno-dipendenti e mantengono l'espressione di marker di differenziamento epiteliale (come le citocheratine 18-19), l'Antigene Prostatico Specifico (PSA), la fosfatasi acida prostatica e i recettori degli androgeni.

- **A549:** linea cellulare ipotriploide ottenuta nel 1972 da Giard *et al.* partendo da tessuto polmonare carcinomatoso proveniente da un uomo di 58 anni di razza caucasica.

- **MCF7:** linea cellulare deriva da metastasi pleurali di adenocarcinoma mammario (Soule *et al.*, 1973). L'assetto cromosomico di queste cellule varia da ipotriploide a ipotetraploide. La linea MCF7 mantiene diverse caratteristiche proprie dell'epitelio mammario differenziato come la capacità di processare l'estradiolo attraverso i recettori degli estrogeni citoplasmatici. Le cellule esprimono l'oncogene WNT7B (Huguet *et al.*, 1994) e sono inibite da TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) (Sugarman *et al.*, 1985).

- **PC3:** linea cellulare derivata da metastasi ossee di adenocarcinoma prostatico di IV grado isolate da un uomo di razza caucasica di 62 anni (Kaighn *et al.*, 1979). Queste cellule sono caratterizzate da un fenotipo androgeno-indipendente, mostrano una debole attività della fosfatasi acida e della testosterone-5- α -reduttasi e possiedono una proteina p53 inattiva.

- **DU145:** linea cellulare ipotriploide isolata da metastasi cerebrali di adenocarcinoma prostatico (Stone *et al.*, 1978).

Le cellule sono androgeno-indipendenti, debolmente positive alla fosfatasi acida e non esprimono l'antigene prostatico (Papsidero *et al.*, 1981).

3.1.2 Mantenimento delle linee cellulari utilizzate

Le linee cellulari WI38, PC3 e DU145 sono state acquistate dall'American Tissue Culture Collection (ATCC) mentre la linea PNT1A è un gentile dono del Professor Maitland (University of York, YCR Cancer Research Unit, Department of Biology). WI38, PNT1A, PC3 e DU145 sono state coltivate, rispettivamente, in mezzo DMEM, RPMI 1640, Ham's F12 e MEM (EuroClone) supplementato con il 10% di FBS (Fetal Bovine Serum, Lonza) e l'1% di L-glutamina (Euroclone), in presenza di penicillina 100 U/mL – streptomina 100 µg/mL (EuroClone), alla temperatura costante di 37°C ed in atmosfera controllata al 5% di CO₂. PNT1A, PC3 e DU145 sono state staccate dal supporto di crescita mediante Tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich), mentre per le WI38 è stata utilizzata Tripsina 0.2% (v/v) (Gibco) in PBS 1x diluita ulteriormente 1:5 in PBS 1x.

Le linee cellulari BEAS2B, HT125, A549, MCF7 sono state invece coltivate in altri laboratori e a noi fornite pronte per l'estrazione dell'RNA.

Soluzioni utilizzate:

Phosphate-buffered Saline (PBS) 1x: NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM.

3.1.3 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto con il reattivo TRIZOL (Invitrogen), utilizzando il metodo guanidinio tiocianato-fenolo-cloroformio, e precipitato con isopropanolo. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo 70% (v/v) in acqua DEPC (dietilpirocarbonato, agente alchilante altamente reattivo in grado di inibire l'attività catalitica

delle RNasi) e risospeso in una soluzione di RNasina H₂O-DEPC contenente 0.2 U/ μ L dell'inibitore di RNasi (Promega). La concentrazione dell'RNA ottenuto è stata quantificata per via spettrofotometrica in biofotometro Eppendorf e ne è stata verificata l'integrità mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

3.1.4 RT-PCR

Per ogni campione sono stati retrotrascritti 2 μ g di RNA totale in volume finale di 20 μ L di reazione. Al template è stata aggiunta H₂O-DEPC-RNasina fino al raggiungimento di un volume finale di 7 μ L e si è proceduto incubando 5 minuti a 100°C e raffreddando velocemente 10 minuti in ghiaccio. Ad ogni reazione sono stati poi aggiunti 12 μ L di una miscela contenente: ImProm-II reaction buffer, MgCl₂ 3mM, dNTPs 0.5 mM e 0.5 μ g di random primers (Promega) e si è incubato 10 minuti a 25°C, permettendo l'annealing degli esameri casuali al template. Dopo l'aggiunta di 1 μ L di ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega), ogni reazione è stata incubata 60 minuti a 42°C per permettere la sintesi e l'estensione del primo filamento di cDNA. L'enzima è stato poi inattivato al calore incubando ogni reazione 15 minuti a 70°C.

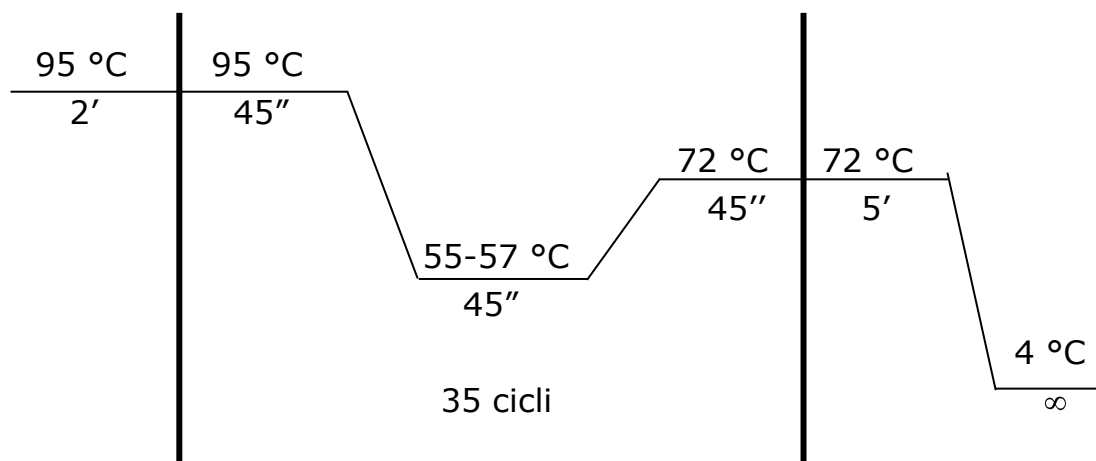
Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato come template in reazioni di PCR per valutare l'espressione relativa delle due varianti trascrizionali di CLU. Sono stati progettati dei primer forward che appaiano nell'esone 1 unico di ogni trascritto (CLU1exon1-fw, CLU2exon1-fw) e quindi in grado di discriminare l'isoforma 1 dalla 2, ed un reverse nell'esone 4 (CLUexon4-rv), zona comune ad entrambi i trascritti. La determinazione del peso molecolare degli ampliconi, inoltre, ha permesso di rilevare la presenza (o l'assenza) dell'esone 2 e di conseguenza eventuali fenomeni di splicing alternativo. Come

controllo positivo è stata amplificata la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), quale gene housekeeper di riferimento.

Le reazioni sono state effettuate utilizzando le coppie di primer, e secondo le condizioni, riportate di seguito.

	primer	sequenza	Tm	
CLU1	CLU1exon1-fw	5' GCGAGCAGAGCGCTATAAAT 3'	60°C	471 bp
	CLUexon4-rv	5' TCAGGCAGGGCTTACACTCT 3'	62°C	
CLU2	CLU2exon1-fw	5' CAGAGCAAGAGGACTCATCC 3'	62°C	608 bp
	CLUexon4-rv	5' TCAGGCAGGGCTTACACTCT 3'	62°C	
GAPDH	GAPDH-fw	5' AACCTGCCAAATATGATGAC 3'	60°C	100 bp
	GAPDH-rv	5' TTGAAGTCAGAGGAGACCAC 3'	60°C	

cDNA	5-15 µL
Primer forward 10 µM	3 µL
Primer reverse 10 µM	3 µL
dNTP mix 10 mM (Promega)	1 µL
GoTaq® Flexi DNA Polimerasi 5U/µL (Promega)	0.5 µL
MgCl ₂ 25 mM (Promega)	6 µL
GoTaq® Flexi Green reaction buffer 5x	10 µL
H ₂ O	x µL
Totale	50 µL



Materiali e metodi

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati caricati su gel di agarosio all'1%, sottoposti a corsa elettroforetica e visualizzati utilizzando un trans-illuminatore UV.

Le dimensioni dei frammenti di DNA sono state valutate confrontandole con il marcatore di peso molecolare "1kb DNA Ladder" (Promega).

3.2 ANALISI "IN SILICO" DI REGIONI REGOLATRICI DEL GENE CLU

È stata effettuata un'analisi "in silico" utilizzando il software MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005) inserendo come input la sequenza genomica del gene *CLU*.

3.3 SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI EPIGENETICI

Le linee cellulari tumorali di prostata PC3 e DU145 sono state trattate con farmaci epigenetici al fine di valutare gli effetti da essi indotti sulla regolazione dell'espressione di Clusterina. Le cellule sono state seminate a bassa densità: 350 000 cells in dish 60 mm x 15 mm e 100 000 cells in dish 35 mm x 15 mm, nel quale è stato preventivamente posizionato un vetrino coprioggetto sterile. A 24 ore dalla semina le cellule sono state trattate con:

- a) tricostatina A (TSA, Sigma-Aldrich), un inibitore delle istone deacetilasi (HDAC) di classe I e II, alla concentrazione di 1 μ M per 24 ore.
- b) 5-aza-2'-deossicitidina (5AzadC, Sigma-Aldrich), conosciuta anche come decitabina, un inibitore delle DNA metiltransferasi (DNMT), alla concentrazione di 10 μ M per 72 ore.
- c) 5-AzadC 10 μ M per tre giorni e successivamente con TSA 1 μ M per un altro giorno.

La somministrazione di 5AzadC è stata rinnovata ogni 24 ore.

Come controllo dell'esperimento sono state utilizzate cellule non trattate e raccolte 48 ore dopo la semina.

Allo scadere dei tempi stabiliti dalle cellule trattate e da quelle di controllo sono stati estratti: RNA, proteine e DNA genomico. I vetrini

coprioggetto sono stati opportunamente fissati e processati secondo quanto meglio descritto nel paragrafo 3.2.3 "Immunocitochimica".

3.3.1 Analisi dei trascritti

Eventuali variazioni nell'espressione relativa dei trascritti di CLU, indotte dalla somministrazione di farmaci epigenetici in PC3 e DU145, sono state analizzate attraverso RT-PCR, utilizzando il protocollo descritto a pagina 102.

3.3.2 Analisi delle proteine

Eventuali variazioni nel profilo di espressione proteica e nella localizzazione cellulare di CLU, indotte dalla somministrazione di farmaci epigenetici in PC3 e DU145, sono state valutate attraverso Western Blot (WB) ed analisi immunocitochimica (ICC).

- **Estrazione e dosaggio delle proteine**

Le cellule PC3 e DU145, trattate con 5AzadC e/o TSA, ed i relativi controlli sono state raccolte, lavate con PBS freddo e lisate in RIPA buffer. I lisati cellulari sono stati mantenuti in agitatore orbitante a 4°C per un'ora e centrifugati a 15 000 g per 20 minuti a 4°C al fine di recuperarne il surnatante. La concentrazione proteica è stata determinata con il lettore di assorbanza per micropiastre "Sunshine" (TECAN) mediante reattivo tipo Bradford, DC Protein assay kit (Bio-Rad), utilizzando soluzioni di albumina sierica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) a concentrazione nota (da 1.25 a 20 µg) come standard per la costruzione della curva di taratura.

Soluzioni utilizzate:

RIPA buffer: Tris-HCl 50 mM pH 8, Triton X-100 1% (v/v), NaCl 150 mM, inibitori di proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) 1 mL ogni 100 mL di tampone.

Phosphate-buffered Saline (PBS) 1x: NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM.

- **SDS-PAGE e Western Blot**

Per ogni condizione sperimentale, 50 µg di proteine totali e 60 µL di mezzo, nel quale sono state coltivate e/o trattate le rispettive cellule, sono stati addizionati di SB (Sample-loading Buffer) 2X, incubati a 100°C per 10 minuti e caricati, in presenza di 10 µl del marcatore di peso molecolare "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard" (Invitrogen), su gel di poliacrilammide al 10% in condizioni riducenti. La corsa elettroforetica è stata effettuata in SDS-running buffer 1X a voltaggio costante pari a 80 V.

Il gel ottenuto, e la membrana in PVDF (Immobilon P, Millipore) preventivamente attivata da lavaggi in metanolo e acqua, sono stati equilibrati in blotting buffer per 15 minuti a temperatura ambiente. Le proteine sono state trasferite sulla membrana mediante elettroblotting a 4°C O/N in blotting buffer 1X. L'efficienza di trasferimento è stata controllata ogni volta mediante colorazione della membrana con reattivo Red Ponceau S (Sigma-Aldrich). I siti di legame aspecifici delle proteine sono stati bloccati incubando le membrane a temperatura ambiente per 4-6 ore in blocking solution 1%. Le membrane sono state ibridate con gli anticorpi primari monoclonali anti-CLU umana clone 41D (Upstate Biotechnology) e anti-PARP, anti-Caspasi 3 e anti-Caspasi 7 umane ("Apoptosis Antibody Sampler Kit", Cell Signaling), diluiti 1:1000 in blocking solution 1% a 4°C O/N e con l'anticorpo monoclonale anti-β-actina umana (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:2000 in blocking solution 1% a temperatura ambiente per un'ora. Sono stati poi effettuati 2 lavaggi da 10 minuti con TTBS 1X ed altri 2 con blocking solution 0.5% (diluita in TBS 1X). La membrana è stata ibridata con un anticorpo secondario adeguato (anti-mouse o anti-rabbit), coniugato alla perossidasi di rafano

Materiali e metodi

(Sigma-Aldrich) e diluito 1:5000 in blocking solution 0.5%, per un'ora a temperatura ambiente. Dopo quattro lavaggi da 15 minuti con TTBS 1X, le membrane sono state trattate con il substrato chemiluminescente, BM chemiluminescence Blotting Substrate, (Roche Diagnostics Corporation) ed esposte alle lastre fotografiche "Hyperfilm ECL" (Amersham) per rilevare eventuali bande immunoreattive.

Composizione gel di poliacrilammide 10%:

Running gel

H ₂ O	4	mL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.5	mL
SDS 10%	100	µL
Mix Acrilammide 30%	3.3	mL
APS 10%	100	µL
TEMED	4	µL

Stacking gel

H ₂ O	2.1	mL
Tris HCl 1 M pH 6.8	380	µL
SDS 10%	30	µL
Mix Acrilammide 30%	500	µL
APS 10%	30	µL
TEMED	3	µL

Soluzioni utilizzate:

Sample-loading Buffer (SB) 2X: Glicerolo 10% (w/v); SDS 1% (w/v); Tris HCl pH 6.8 100 mM; DTT 65mM; blu di bromofenolo.

SDS Running buffer 10X: Tris-HCl 250 mM pH 8.3; Glicina 1.92 M; SDS 1% (w/v)

Blotting Buffer: Tris-HCl 48 mM; glicina 39 mM; metanolo 10% (w/v).

Red Ponceau: Red ponceau in polvere 0.1% (w/v); acido acetico 5% (v/v) in acqua.

TCA (Acido Tricloro Acetico) 20X: 100 g di TCA; 227 mL di acqua.

TBS 10X (Tris Buffered Saline): Tris-HCl pH 7.5 50 mM; NaCl 150 mM.

Blocking Solution 1%: Tween 0.2% (v/v); NaOH 1N, 1% (v/v); blocking reagent 1% (v/v).

TTBS 1X: Tween 0.1% (w/v) in TBS 1X.

- **Immunocitochimica**

Le cellule di controllo e le cellule trattate, dopo un lavaggio con Dulbecco's Phosphate-buffered Saline with calcium and magnesium (D-PBS) 1X, sono state fissate e permeabilizzate immergendo i vetrini coprioggetto in una soluzione di metanolo/acetone 1:1 ed incubandoli 10 minuti a -20°C. Dopo aver lasciato asciugare i vetrini all'aria, è stato effettuato un lavaggio di 10 minuti con D-PBS. I siti immunoreattivi aspecifici sono stati bloccati incubando i vetrini 20 minuti a temperatura ambiente con horse serum blocking solution in camera umida. Al termine del blocco sono stati effettuati due lavaggi da 10 minuti con D-PBS addizionato di BSA 0.3% (w/v). Per l'ibridazione si è utilizzato lo stesso anticorpo primario antiCLU descritto per l'analisi western blot, diluendolo 1:50 in D-PBS addizionato di BSA 3% (w/v), ed incubando i vetrini un'ora a temperatura ambiente in camera umida. Dopo due lavaggi con D-PBS + BSA 0.3%, si è proceduto ibridando un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario fluorescente anti-mouse "Alexa Fluor™ 488" (Invitrogen) diluito 1:50 in D-PBS + BSA 3%. Dopo due lavaggi con D-PBS + BSA 0.3% e uno con D-PBS, i nuclei sono stati colorati per 5 minuti a temperatura ambiente con DAPI 5% (4',6-diamidino-2-fenilindolo, Sigma-Aldrich) diluito 1:5000 in D-PBS, in camera umida al buio. I vetrini coprioggetto sono stati quindi lavati con D-PBS e montati con Mowiol (Sigma-Aldrich) su un vetrino da microscopia. I campioni così preparati sono stati visualizzati mediante microscopio a fluorescenza tipo Zeiss Axiovert 200 e le relative immagini digitali

Materiali e metodi

sono state acquisite mediante videocamera a colori direttamente collegata al microscopio.

Soluzioni utilizzate:

Dulbecco's Phosphate-buffered Saline with calcium and magnesium (D-PBS) 1X: CaCl₂·2H₂O 0.9 mM; MgCl₂·6H₂O 0.5 mM; KCl 2.7 mM; KH₂PO₄ 2 mM; NaCl 137 mM ; Na₂HPO₄ 10 mM;

Horse serum blocking solution: 15 µL horse serum (Sigma-Aldrich) in 1.3 mL di D-PBS

DAPI: DAPI 5% (w/v) in PBS

Mowiol: glicerolo 3% (w/v); mowiol 0.13% (w/v); 6 mL acqua; 12 mL Tris-HCl 0.2M pH 8.5

3.3.3 Analisi del DNA genomico

Lo stato di metilazione della isole CpG, presenti nella regione genomica identificata come promotore di CLU, è stato analizzato tramite Methylation Specific PCR (MSP) nelle linee cellulari WI38, PC3 e DU145. In seguito, con la stessa procedura, sono state valutate eventuali variazioni nello stato di metilazione di tali regioni, indotte dalla somministrazione 5AzadC, in PC3 e DU145.

- **Methylation Specific PCR (MSP)**

La MSP è una tecnica di PCR che permette di analizzare lo stato di metilazione delle isole CpG presenti nella zona promotrice di un gene (Herman *et al.*, 1996). L'incubazione del DNA d'interesse con bisulfito di sodio provoca la conversione dei residui di citosina non metilata in uracile, mantenendo invece le citosine metilate invariate. Il trattamento con bisulfito genera quindi sequenze differenti di DNA in caso di DNA metilato e non.

	Sequenza originale	Trattamento con bisulfito
DNA non metilato	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
DNA metilato	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N

Per discriminare lo stato di metilazione della zona di interesse sono state effettuate due reazioni di PCR separate con due coppie di primer M (methylated) e U (unmethylated), complementari rispettivamente al DNA convertito eventualmente metilato o non metilato. Per verificare invece l'efficienza di conversione sono state allestite due reazioni di PCR con una coppia di primer W (wild-type) in grado di appaiare alla sequenza di DNA wild-type presente nell'organismo, utilizzando alternativamente come template il DNA genomico estratto dalle cellule o lo stesso convertito con bisulfite.

Estrazione del DNA genomico.

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il "QIAamp DNA mini Kit" (Qiagen), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Brevemente:

alle cellule raccolte, pellettate e risospese in 200 μ L di PBS, sono stati aggiunti 20 μ L di QIAGEN Proteinase K e 200 μ L del buffer di lisi AL e si è proceduto incubando a 56 °C per 10 minuti. Dopo l'aggiunta di 200 μ L di etanolo 100%, la soluzione è stata trasferita in colonnina "QIAamp Mini spin column" e si è centrifugato a 6000 g per 1 minuto per eliminare il filtrato. Dopo alcuni lavaggi della colonnina con i buffer AW1 e AW2, contenenti etanolo 100%, si è proceduto effettuando due eluizioni separate con 100 μ L di buffer AE.

La concentrazione del gDNA così ottenuto è stata quantificata per via spettrofotometrica in biofotometro Eppendorf.

Conversione con bisulfite di sodio

Per ogni condizione sperimentale sono stati convertiti 2 μ g di DNA genomico utilizzando "Epitect Bisulfite Kit" (Qiagen), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Brevemente:

Materiali e metodi

le reazioni di conversione sono state assemblate in tubi da PCR ed incubate in termociclatore secondo le condizioni riportate nella pagina seguente.

gDNA (2 µg)	x	µL
Bisulfite Mix	85	µL
DNA Protect Buffer	35	µL
RNAse-free H ₂ O	x	µL
Volume Totale	140	µL

Step	Tempo	Temperatura
Denaturazione	5 minuti	95 °C
Incubazione	25 minuti	60 °C
Denaturazione	5 minuti	95 °C
Incubazione	85 minuti	60 °C
Denaturazione	5 minuti	95 °C
Incubazione	175 minuti	60 °C
Mantenimento	∞	20 °C

Terminata la reazione si è proceduto alla purificazione del DNA convertito. Dopo l'aggiunta di 560 µL di Buffer di caricamento BL, la soluzione è stata trasferita in colonnina "Epitect spin column" e si è centrifugato alla massima velocità per 1 minuto per eliminare il filtrato. Dopo un lavaggio con il buffer BW, sono stati aggiunti 500 µL di buffer BD e si è incubato 15 minuti a temperatura ambiente per permettere la desulfonazione del DNA convertito. Dopo due lavaggi con il buffer BW, la colonnina è stata incubata 5 minuti a 56 °C per permettere l'evaporazione di eventuali residui di liquido. Infine si è proceduto effettuando due eluizioni separate con 20 µL di buffer EB.

Il DNA genomico convertito con bisulfito così ottenuto è stato quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop

Progettazione dei primer

I primer sono stati disegnati utilizzando il software "Methprimer" (Li e Dahiya, 2002) inserendo come input la sequenza corrispondente a 2000 paia-basi a monte e a valle del sito di inizio trascrizione dell'isoforma 1 (TSS1) di CLU. Il programma ha individuato due isole CpG >100 bp con una percentuale di GC > 50 (isola 1: nucleotidi dal 1790 al 1998, isola 2: dal 2014 al 2177) situate appena prima e appena dopo la TSS1 di CLU (nucleotide 2000 della sequenza input); queste zone sono state quindi scelte per posizionare i diversi primer forward e reverse.

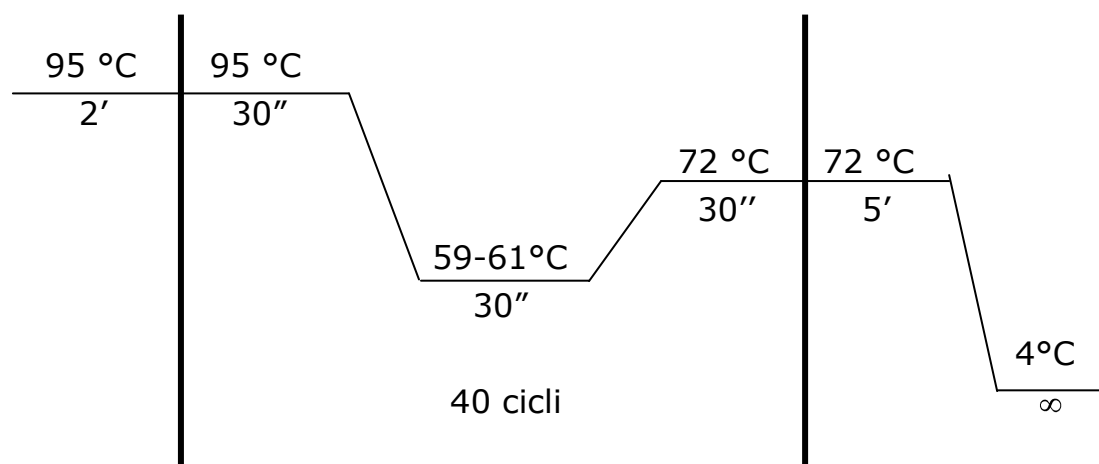
	primer	sequenza	Tm	
CLU M	CLU-M-fw	5' ATTGGGATAGATAGTCGGGTTAATC 3'	70°C	115 bp
	CLU-M-rv	5' CTCCAAAAAAAAACCCTAAAATACG 3'	64°C	
CLU U	CLU-U-fw	5' TTGGGATAGATAGTTGGGTTAATTG 3'	66°C	116 bp
	CLU-U-rv	5' AACTCCAAAAAAAAACCCTAAAATAC 3'	66°C	
CLU WT	CLU-WT-fw	5' AGACAGCCGGGCTAACCGC 3'	64°C	101 bp
	CLU-WT-rv	5' GAGAGACCCTGAGGTGCGG 3'	64°C	

Materiali e metodi

PCR

Le reazioni sono state effettuate seguendo le condizioni sotto riportate.

DNA (20 ng/ μ L)	5.00 μ L
Primer forward 10 μ M	1.5 μ L
Primer reverse 10 μ M	1.5 μ L
dNTP mix 10 mM (Promega)	1.00 μ L
GoTaq [®] Hot Start DNA Polimerasi 5U/ μ L (Promega)	0.25 μ L
MgCl ₂ 25 mM (Promega)	4.00 μ L
GoTaq [®] Hot Start Green reaction buffer 5x	10.00 μ L
H ₂ O	26.75 μ L
Totale	<hr/> 50.00 μ L



Capitolo 4: RISULTATI

4.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA RELATIVA DELLE VARIANTI TRASCRIZIONALI DI CLU IN DIVERSE LINEE CELLULARI UMANE

La distribuzione delle isoforme 1 e 2 di Clusterina è stata investigata in linee cellulari umane normali (WI38, HT125), immortalizzate (BEAS2B, PNT1A) e tumorali (A549, MCF7, PC3 e DU145). È stato possibile discriminare i due trascritti utilizzando, nelle reazioni di RT-PCR, dei primer forward specifici per l'esone 1, unico in ogni isoforma, abbinato ad un reverse che ibridizza nella regione condivisa dalle due varianti trascrizionali. Inoltre, così facendo, in base al peso molecolare della banda corrispondente all'isoforma 1, è stato possibile individuare l'eventuale presenza (o assenza) del messaggero descritto da Leskov *et al.*, un trascritto più corto, prodotto attraverso splicing alternativo, in cui l'esone 1 dell'Isoforma 1 è direttamente legato all'esone 3.

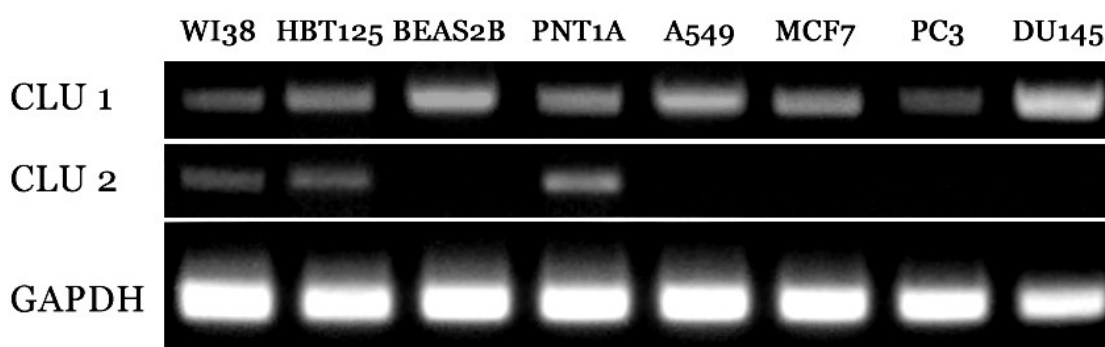


Figura 4.1: Livelli di espressione delle due varianti trascrizionali di CLU in linee cellulari umane normali, immortalizzate e tumorali.

CLU 1= Clusterina Isoforma 1, CLU 2= Clusterina Isoforma 2

GAPDH= gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi

Come mostrato in figura 4.1, l'Isoforma 1 è espressa sia in cellule normali che in cellule tumorali. L'Isoforma 2, invece, è virtualmente

Risultati

assente in tutte le linee trasformate analizzate ed è espressa a livelli rilevabili solo nelle cellule normali (WI38, HT125) e nella linea normale immortalizzata PNT1A. Inoltre, non è stato evidenziato nessun fenomeno di splicing alternativo in nessuna delle linee cellulari considerate, in quanto gli ampliconi corrispondenti all'Isoforma 1 (NM_001831.2: nucleotidi dal 67 al 537) e all'Isoforma 2 (NM_203339.1: nucleotidi dal 50 al 657) sono delle dimensioni attese e non sono state rilevate bande di peso molecolare inferiore (riconducibili ad una condizione in cui l'esone 2 viene a mancare).

4.2 ANALISI "IN SILICO" DI REGIONI REGOLATRICI DEL GENE *CLU*

È stata effettuata una semplice analisi "*in silico*" al fine di individuare possibili regioni regolatrici per il gene della Clusterina. È stato quindi utilizzato il programma MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005), inserendo come input circa 2000 bp a monte e a valle del sito di inizio trascrizione dell'isoforma 1 (TSS1) di *CLU*, per identificare potenziali regioni promotrici e siti di legame per attivatori e/o repressori trascrizionali. Da questo studio è emersa la presenza di almeno due regioni promotrici, posizionate rispettivamente a monte dei siti di inizio trascrizione dell'Isoforma 1 e dell'Isoforma 2 (figura 4.2). La prima sequenza regolatrice, denominata P1, è localizzata nella regione 5' fiancheggiante il gene *CLU* e corrisponde essenzialmente al promotore descritto da Wong *et al.* nel 1994. Questa regione possiede un promotore minimale di circa 150 nucleotidi che comprende una TATA box, i siti di legame per SP1 e SP2, e l'elemento CLE. La seconda regione promotrice che abbiamo identificato, denominata P2, si trova invece nel primo introne del

gene, appena prima del sito di inizio trascrizione dell'isoforma 2 (TSS2). Di questa regione non vi sono precedenti informazioni in letteratura.

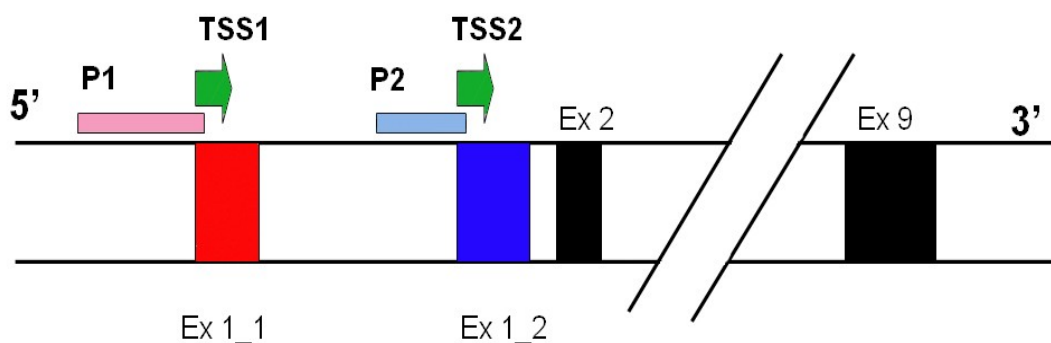


Figura 4.2: Putative regioni promotrici del gene umano *CLU*.

In questa raffigurazione schematica del gene *CLU* sul cromosoma 8, i blocchi neri rappresentano gli esoni dal 2 al 9, comuni ai due trascritti, mentre i blocchi colorati si riferiscono agli esoni unici (Ex1_1, Ex1_2) delle due isoforme di *CLU*. TSS1 and TSS2, indicati come frecce verdi, rappresentano i siti di inizio di trascrizione di *CLU1* e *CLU2*, come confermato tramite analisi CAGE (Cap Analysis Gene Expression). P1 and P2 indicano le due putative regioni promotrici identificate mediante l'analisi "in silico" effettuata con software il MatInspector (modificato da Rizzi *et al.*, 2009).

4.3 EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI EPIGENETICI IN LINEE CELLULARI DI CANCRO PROSTATICO

4.3.1 Effetti sull'espressione genica delle varianti trascrizionali di *CLU*

Le linee cellulari PC3 e DU145 sono state trattate con l'inibitore di istone deacetilasi (HDAC) tricostatina A (TSA) e/o con l'inibitore di DNA metiltransferasi (DNMT) 5-aza-2'deossicitidina (5AzadC). Eventuali variazioni nell'espressione dei due trascritti di *CLU*, indotte dalla somministrazione di questi farmaci epigenetici, sono state analizzate attraverso RT-PCR. Come controllo dell'esperimento sono state utilizzate cellule non trattate e raccolte 48 ore dopo la semina.

Risultati

Come mostrato in figura 4.3, nelle PC3 l'espressione dell'Isoforma 1 rimane pressoché invariata nelle diverse condizioni sperimentali mentre sembra aumentare nelle cellule DU145 a seguito del trattamento con farmaci epigenetici, in particolar modo nelle condizioni in cui è stata impiegata tricostatina (T, A+T). L'Isoforma 2, invece, assente nei controlli, appare riattivata in entrambe le linee cellulari, in seguito alla somministrazione combinata di 5-aza-2'deossicitidina e tricostatina (A+T).

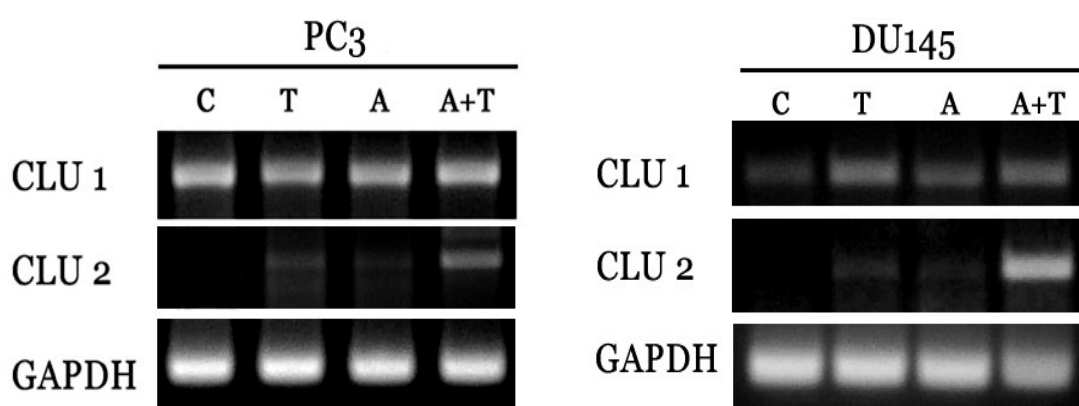


Figura 4.3: Livelli di espressione delle isoforme di CLU in seguito al trattamento di linee cellulari di cancro prostatico con farmaci epigenetici.

CLU 1= Clusterina Isoforma 1, CLU 2= Clusterina Isoforma 2

GAPDH= gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi

C= controllo, T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore, A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore, A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

4.3.2 Effetti sul profilo di espressione proteica di CLU

Il pattern proteico di espressione di CLU è stato valutato tramite analisi Western Blot (WB) nella linea cellulare umana normale WI38 coltivata in condizioni standard e nelle linee di tumore prostatico PC3 e DU145 prima e dopo la somministrazione di tricostatina e/o 5-aza-2'deossicitidina. Sono stati analizzati sia gli

estratti cellulari che i mezzi di coltura, per visualizzare le forme intracellulari di Clusterina ed la forma secreta.

Cellule WI38, cresciute per 48 ore in condizioni standard fino al raggiungimento di una confluenza di circa l'80%, producono e secernono quantità di CLU più elevate di quelle riscontrate nelle cellule trasformate. Infatti negli estratti proteici totali di WI38 è presente sia il precursore non clivato di CLU (psCLU) sia la sua forma matura pronta per la secrezione (sCLU) (figura 4.4, lane 1). Nel mezzo di coltura di tali cellule si ritrova abbondante CLU secreta (figura 4.4, lane 2).

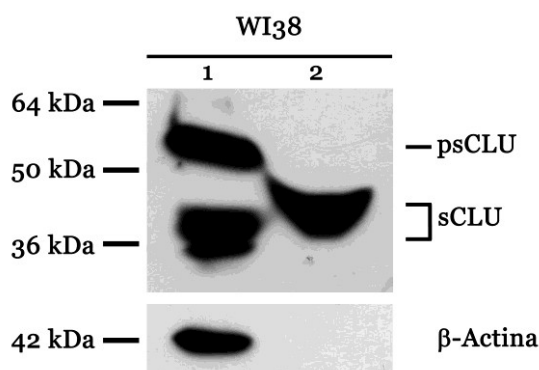


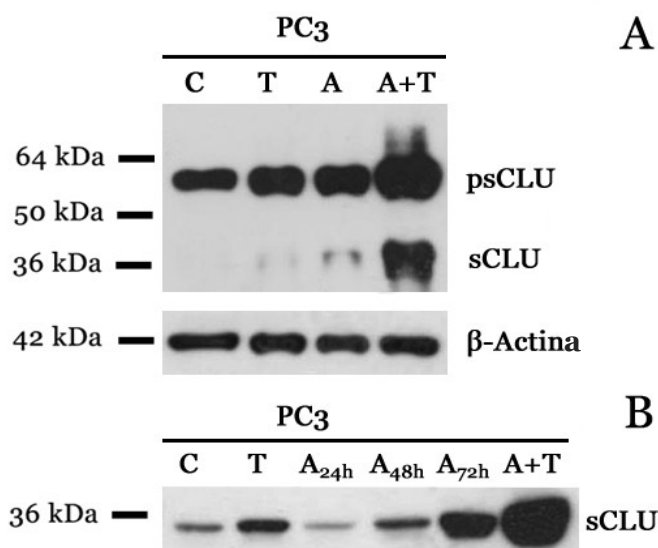
Figura 4.4: Profilo di espressione di CLU nella linea cellulare umana normale WI38.

1= estratto proteico totale,
2= mezzo di coltura.
pSCLU= Clusterina pre-secretoria,
sCLU= Clusterina

I livelli di CLU intracellulare e secreta in cellule di tumore prostatico cresciute in condizioni standard, in particolare in DU145, sono notevolmente inferiori rispetto a quelli riscontrati in WI38, a parità di proteine totali caricate in μg (figure 4.5 e 4.6). La somministrazione di 5AzadC e TSA, specialmente quando combinata (A+T), incrementa la produzione del precursore e della forma intracellulare matura di CLU sia in PC3 che in DU145. Coerentemente, la sCLU aumenta nei mezzi di coltura di entrambe le linee cellulari cresciute in presenza di 5-aza-2'deossicitidina e tricostatina (T, A, A+T) rispetto alle stesse cellule mantenute in condizioni standard (C)(figure 4.5 e 4.6). Inoltre, soltanto nella linea cellulare DU145, in seguito al trattamento con i farmaci epigenetici (T, A, A+T), compare una banda di 45 kDa.

Risultati

Questa banda, la cui intensità aumenta nella condizione A+T, è attribuibile alla forma troncata pro-apoptotica della proteina a localizzazione nucleare (nCLU)(figura 4.6).



A

Figura 4.5: Profilo di espressione proteica di CLU in cellule di cancro prostatico PC3, prima e dopo il trattamento con farmaci epigenetici.

A) estratti proteici totali.

B) mezzi di coltura.

C= controllo

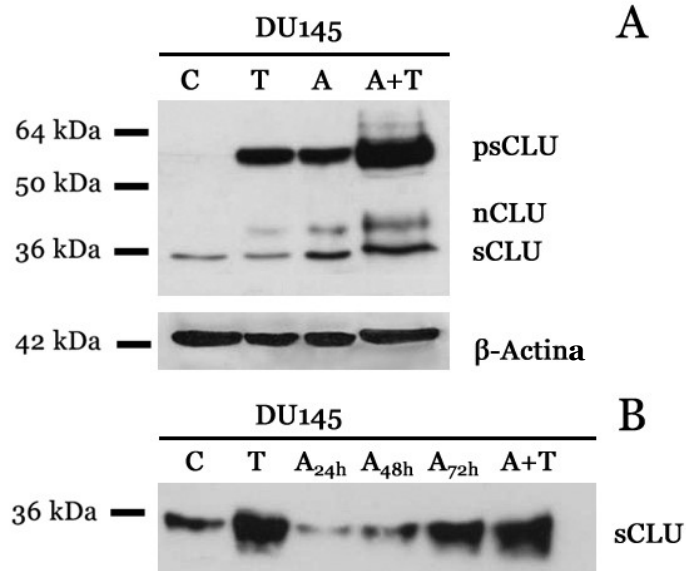
T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore,

A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore,

A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

psCLU= clusterina pre-secretoria, sCLU= clusterina secreta.

B



A

Figura 4.6: Profilo di espressione proteica di CLU in cellule di cancro prostatico DU145, prima e dopo il trattamento con farmaci epigenetici.

A) estratti proteici totali.

B) mezzi di coltura.

C= controllo

T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore,

A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore,

A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

psCLU= clusterina pre-secretoria, sCLU= clusterina secreta,

nCLU= clusterina nucleare.

B

3.3 Effetti sulla localizzazione di CLU

Le linee PC3 e DU145, prima e dopo la somministrazione di tricostatina e/o 5-aza-2'deossicitidina, secondo i tempi sperimentali previsti, sono state sottoposte ad analisi immunocitochimica (ICC) per individuare eventuali cambiamenti nell'espressione e nella localizzazione cellulare di Clusterina rispetto ai controlli non trattati. Nella linea PC3, come mostrato in figura 4.7, nelle cellule di controllo (C) il segnale specifico corrispondente a CLU è debole, mentre nelle cellule sottoposte a trattamento con farmaci epigenetici (T, A, A+T) questo tende ad aumentare d'intensità in modo particolare quando 5-AzadC e TSA sono somministrate in combinazione (A+T). La localizzazione di CLU, invece, si mantiene a livello citoplasmatico in tutte le condizioni sperimentali analizzate.

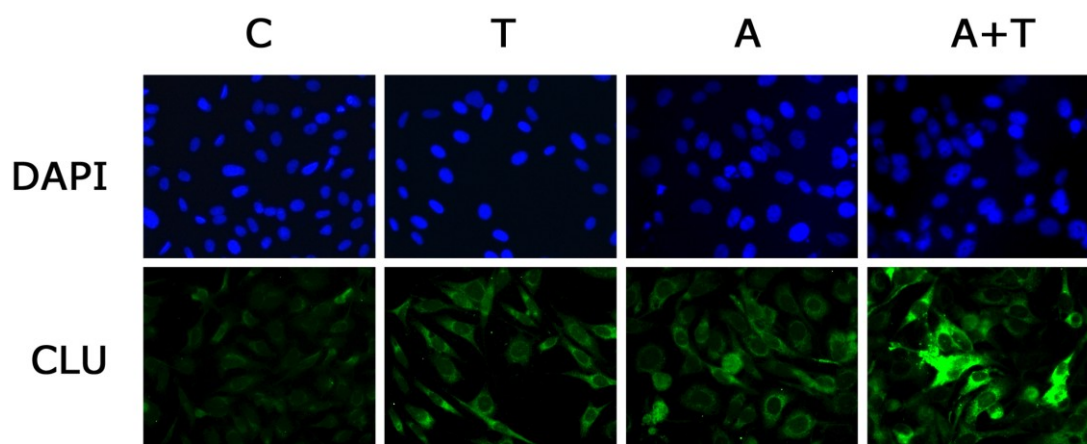


Figura 4.7: Localizzazione cellulare di CLU in PC3, prima e dopo la somministrazione di farmaci epigenetici.

Immagini acquisite tramite microscopia a fluorescenza con un obiettivo ad ingrandimento 20x.

DAPI= marcatura dei nuclei

C= controllo, T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore,

A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore,

A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

Risultati

Anche nella linea DU145, come mostrato in figura 4.8, si nota un incremento nell'espressione di CLU infatti l'intensità del segnale aumenta passando dalle cellule cresciute in condizioni standard (C) a quelle sottoposte al trattamento con farmaci epigenetici (T, A, A+T). La proteina, presente a livello citoplasmatico nel controllo (C), tende invece a localizzarsi principalmente a livello perinucleare quando alle cellule vengono somministrate separatamente 5AzadC (A) e TSA (T) ed ad accumularsi nel nucleo di cellule prossime alla morte nella condizione di trattamento combinato con i due farmaci (A+T).

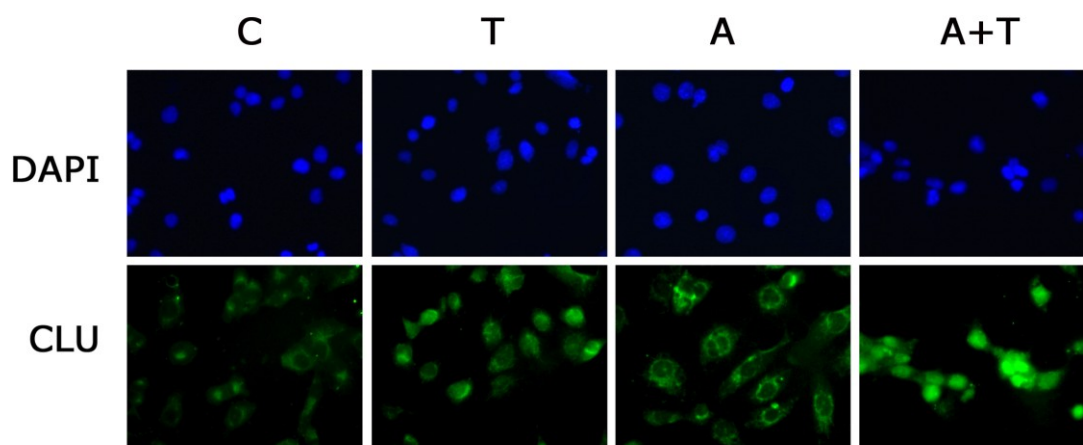


Figura 4.8: Localizzazione cellulare di CLU in DU145, prima e dopo la somministrazione di farmaci epigenetici.

Immagini acquisite tramite microscopia a fluorescenza con un obiettivo ad ingrandimento 20x.

DAPI= marcatura dei nuclei

C= controllo, T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore,

A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore,

A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

4.3.4 Effetti a livello cellulare

La morfologia delle linee cellulari tumorali PC3 e DU145 è stata osservata attraverso microscopia in contrasto di fase, prima e dopo la somministrazione dei farmaci epigenetici. Come mostrato in figura 4.9, entrambe le linee cellulari tendono a perdere la propria morfologia tipica (C) (cuboidale in DU145, stellata con presenza di pseudopodi in PC3) in seguito ai trattamenti (T, A, A+T).

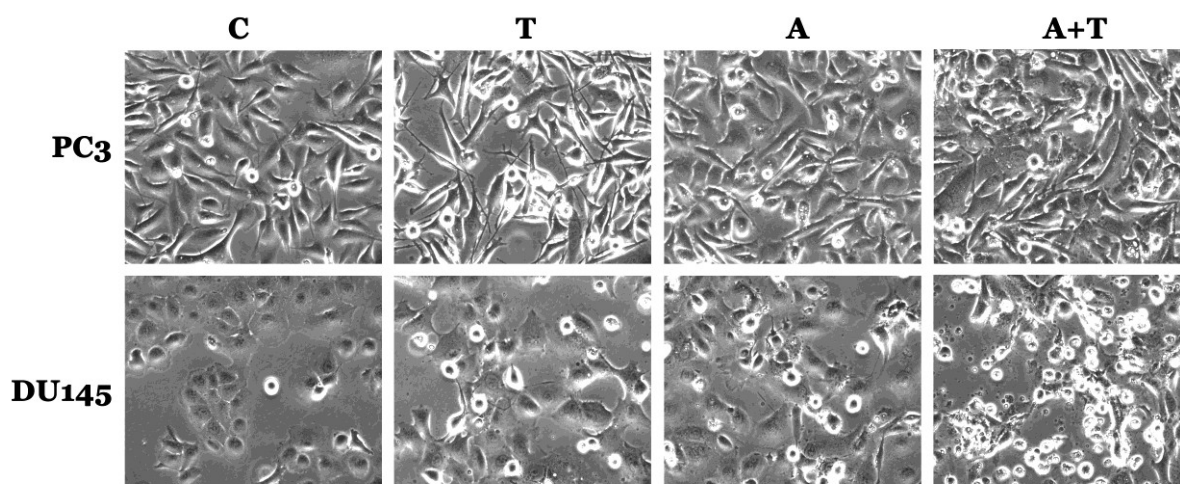


Figura 4.9: Morfologia cellulare di PC3 e DU145 prima e dopo la somministrazione di farmaci epigenetici.

Immagini acquisite in contrasto di fase con un ingrandimento 20x.

C= controllo, T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore, A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore, A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

Questo fenomeno è decisamente più marcato nella linea DU145, dove l'arrotondamento ed il successivo distacco delle cellule dal supporto di crescita è maggiormente evidente. Inoltre, in DU145 ma non in PC3, nel caso di somministrazione combinata di 5AzadC e TSA (A+T), si osserva una notevole frammentazione cellulare, senza rilascio di citoplasma, che porta alla formazione di corpi apoptotici (figura 9). Questo fenomeno, denominato "blebbing", si verifica quando nelle cellule è stato innescato il processo di morte programmata per apoptosi. Per verificare questa ipotesi, il profilo di espressione dell'enzima Poli(ADP-Ribosio) polimerasi-1 (PARP-1) è stato valutato

Risultati

tramite WB, in entrambe le linee cellulari di cancro prostatico, nelle diverse condizioni sperimentali d'interesse. Questa proteina costituisce il principale membro della famiglia di enzimi PARP che catalizzano il trasferimento di ADP-ribosio dal NAD ai gruppi carbossilici di varie proteine nucleari. PARP-1 è attivata in risposta a danni del DNA e riveste un ruolo importante nei meccanismi di "base excision repair" e apoptosi. In particolare, durante il processo apoptotico, il precursore di PARP-1 (116 kDa) viene clivato dalle caspasi 3 o dalla caspasi 7, generando due frammenti proteici di 27 e 89 kDa (PARP1 attivata). Le procaspasi 3 e 7, a monte, sono attivate a loro volta dalle caspasi iniziatrici.

In PC3, in tutte le condizioni analizzate è presente esclusivamente il precursore inattivo di PARP1, e la forma inattiva (pro-caspasi) delle caspasi 3 e 7 (figura 4.10).

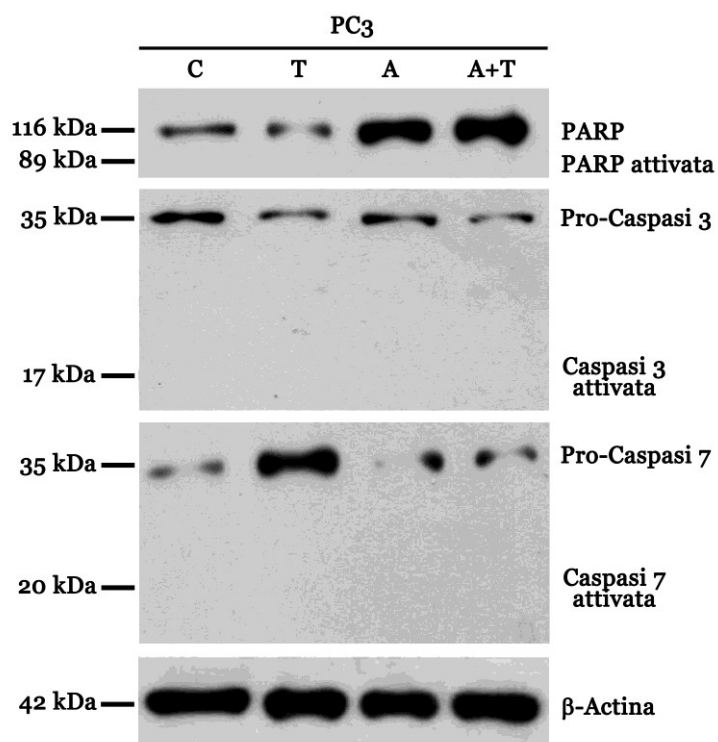


Figura 4.10: Profilo di espressione proteica in PC3 di PARP-1, caspasi 3 e caspasi 7, prima e dopo il trattamento con farmaci epigenetici.

C= controllo, T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore,
A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore, A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

In DU145, invece, a conferma di quanto osservato a livello morfologico, nella condizione A+T è presente la banda di 89 kDa corrispondente alla PARP-1 clivata, e quindi attivata ad opera delle caspasi 3 e 7, coerentemente presenti anch'esse nella loro forma attiva (figura 4.11).

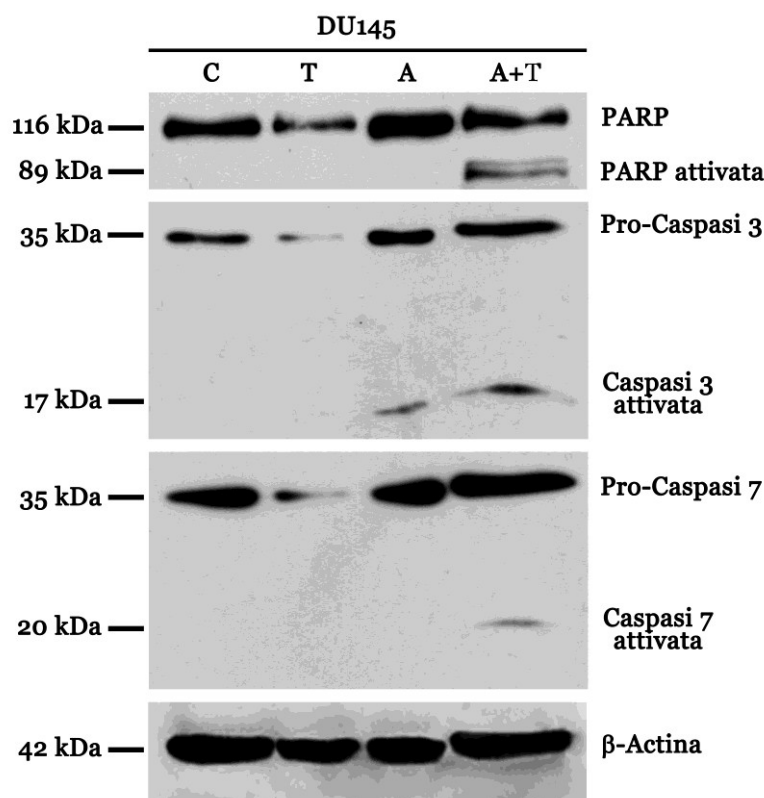


Figura 4.11: Profilo di espressione proteica in DU145 di PARP-1, caspasi 3 e caspasi 7, prima e dopo il trattamento con farmaci epigenetici.

C= controllo, T= cellule trattate con TSA 1 μ M per 24 ore, A= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore, A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

4.3.5 Stato di metilazione delle isole CpG presenti nel promotore di CLU

Nella regione genomica di *CLU*, il software "Methprimer" (Li e Dahiya, 2002) ha predetto la presenza di due isole CpG potenzialmente oggetto di metilazione. Queste due sequenze, situate appena prima e appena dopo il sito di inizio trascrizione di *CLU1*,

Risultati

superano le 100 bp di lunghezza ed hanno una percentuale di GC maggiore del 50%. Lo stato di metilazione di tali regioni, analizzato tramite Methylation Specific PCR (MSP; Herman *et al.*, 1996), è risultato differente nelle diverse linee cellulari analizzate (figura 4.12). Nelle cellule normali WI38 le isole CpG risultano non metilate, mentre nelle cellule di tumore prostatico appaiono metilate. In particolare, la metilazione risulta completa per la linea PC3 e parziale in DU145.

In seguito, dopo il trattamento con i farmaci epigenetici di PC3 e DU145, sono state valutate, con la stessa procedura, eventuali variazioni nello stato di metilazione di tali regioni. Come mostrato nella figura 4.13, in entrambe le linee cellulari, non sono stati individuati cambiamenti rilevanti indotti da 5AzadC nello stato di metilazione delle isole CpG, né quando somministrata singolarmente (A), né quando utilizzata in combinazione con TSA (A+T).

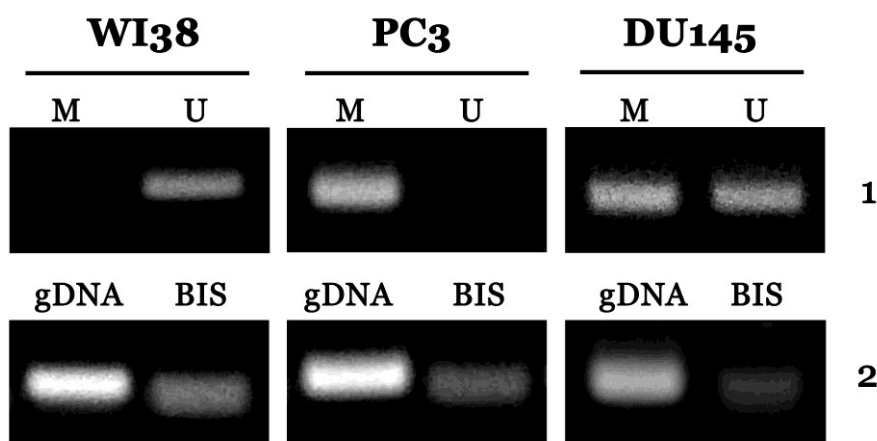


Figura 4.12: Stato di metilazione delle isole CpG di *CLU* in cellule normali e di tumore prostatico.

1) MSP, 2) Efficienza di conversione con bisulfito.

M= primers DNA metilato, U= primers non DNA metilato.

gDNA= Dna genomico, BIS= Dna genomico convertito con bisulfito.

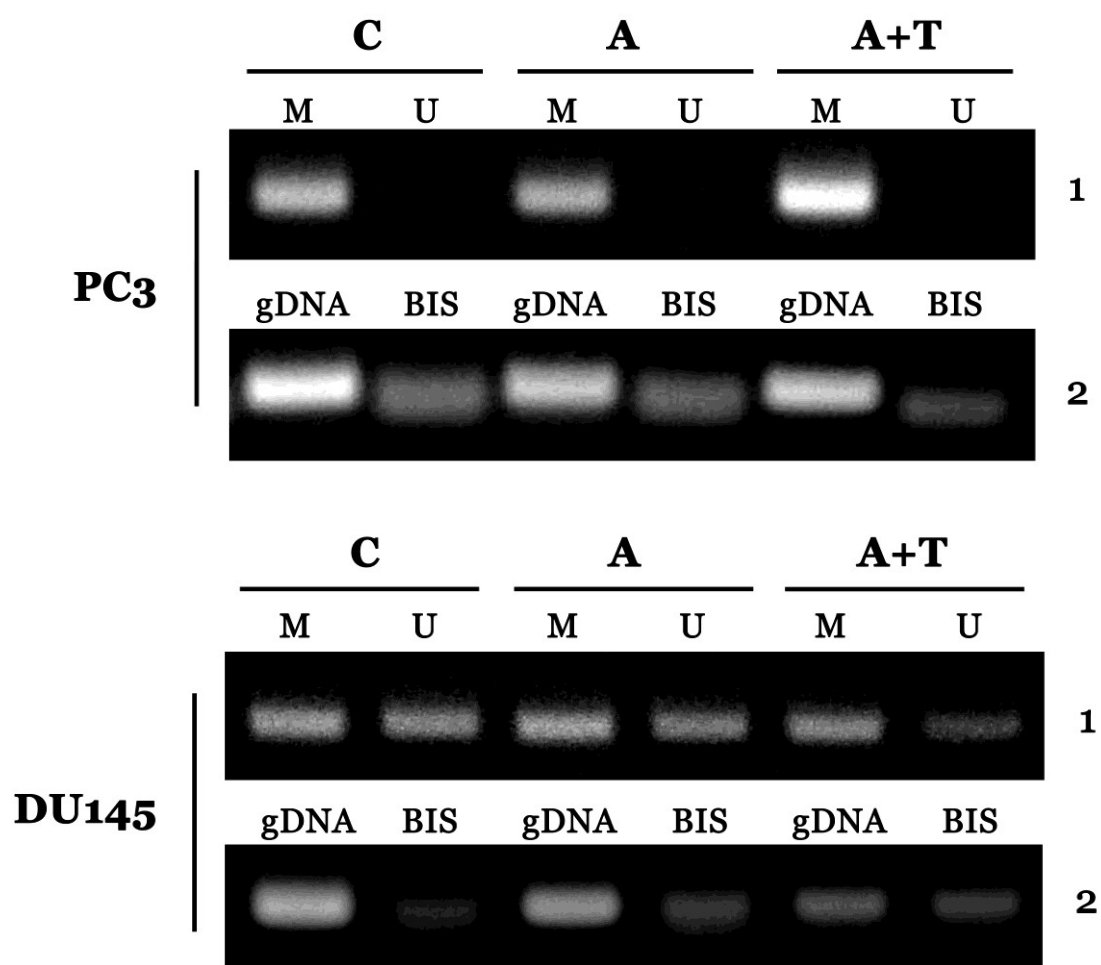


Figura 4.13: Stato di metilazione delle isole CpG di *CLU* in PC3 e DU145, prima e dopo il trattamento con farmaci epigenetici.

1) MSP

2) Efficienza di conversione con bisulfito.

C= controllo, A= cellule trattate con 5-5AzadC 10 μ M per 72 ore,

A+T= cellule trattate con 5AzadC 10 μ M per 72 ore e con TSA 1 μ M per ulteriori 24 ore.

M= primers per DNA metilato, U= primers per non DNA metilato.

gDNA= Dna genomico, BIS= Dna genomico convertito con bisulfito.

Capitolo 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Fin dalla sua scoperta la Clusterina (CLU) ha impegnato diversi gruppi di ricerca in tutto il mondo nel tentativo di svelarne la precisa funzione biologica nell'uomo e nei mammiferi in generale. Ad oggi, dopo quasi 20 anni di studio, CLU è ancora considerata una proteina "enigmatica", nonostante il consenso generale sul fatto che essa sia una proteina ubiquitaria, presente nella maggior parte dei fluidi biologici, ed implicata in quasi tutti i processi fisiologici fondamentali dell'organismo umano e nello sviluppo di diverse malattie come il cancro e l'Alzheimer. Questa definizione deriva dal fatto che, nonostante l'elevato numero di produzioni a carattere scientifico ad essa dedicate, esiste ancora una sostanziale carenza di informazioni basilari sui processi che ne regolano la complessa espressione e l'attività biologica con particolare riferimento alle sue forme molecolari. Infatti deve ancora essere fatta chiarezza sui meccanismi molecolari che portano alla produzione di due varianti trascrizionali a partire da un unico gene. In GenBank, infatti, esistono due sequenze di riferimento per l'mRNA di CLU, denominate "Isoforma 1" (CLU1) ed "Isoforma 2" (CLU2), identificate rispettivamente dai codici di accesso NM_001831 ed NM_203339 e presenti esclusivamente nei primati, le quali hanno sostituito la precedente sequenza M64722.1. Queste due varianti trascrizionali condividono la sequenza nucleotidica dall'esone 2 all'esone 9 e la regione 3' non tradotta, ma possiedono un esone 1 unico. L'esone 1 dell'Isoforma 1 possiede un AUG in frame con il resto della sequenza, mentre quella dell'Isoforma 2 corrisponde ad una regione non tradotta 5'UTR. Le due isoforme sono ancora scarsamente studiate, anche se, ne è stata verificata la coesistenza mediante Real Time PCR e l'espressione differenziale in cellule tumorali di prostata ed in cellule epiteliali trasformate e normali di colon (Cochrane *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2007). Inoltre, nel 2003, Leskov e colleghi hanno individuato nella linea cellulare MCF7 un ulteriore messaggero nel quale, in seguito ad un fenomeno di

splicing alternativo, l'esone 1 dell'Isoforma 1 è direttamente legato all'esone 3. Attualmente in letteratura sono descritte differenti forme proteiche di Clusterina caratterizzate da funzioni e localizzazioni cellulari differenti: la forma presecretoria (psCLU), la forma secreta (sCLU), la forma nucleare (nCLU). La traduzione a partire dall'AUG nell'esone 2, presente in entrambe le isoforme, genera una preproteina che viene processata mediante la via RE/Golgi (Wong *et al.*, 1994). La prima modificazione è una mannosilazione che avviene a livello del reticolo endoplasmatico e produce il precursore di circa 60 kDa (psCLU), che una volta processato porta alla produzione della proteina matura destinata alla secrezione (sCLU) (Jenne e Tschopp, 1989; Choi-Miura *et al.*, 1992; Parodi, 2000; Roth e Berger, 1982; Moremen e Touster, 1985). sCLU si presenta come un eterodimero $\alpha\beta$ estensivamente glicosilato di circa 75-80 kDa e si comporta come un chaperone molecolare ATP indipendente (Wilson e Easterbrook-Smith, 2000; Bailey *et al.*, 2001; Poon *et al.*, 2000). La traduzione a partire dal codone d'inizio presente nel terzo esone, anch'esso comune ed entrambe le isoforme, genera invece una forma a localizzazione nucleare (nCLU o forma troncata) con funzione proapoptotica del peso di 45-50 kDa (Caccamo *et al.*, 2003; Moretti *et al.*, 2007). Infine secondo Leskov e colleghi un messaggero alternativo di CLU, ottenuto per splicing alternativo, è costitutivamente espresso nella linea cellulare MCF7 e codifica per un putativo precursore della forma nucleare di CLU (pnCLU). La scoperta che da un unico gene si producono più forme proteiche, con diversa localizzazione cellulare, cui corrisponde anche un diverso e talora opposto significato funzionale è servita a risolvere alcune controversie. Tuttavia non è ancora noto il legame che associa ognuno di questi trascritti alle diverse forme proteiche di CLU, né lo specifico meccanismo di azione di queste ultime. Ad oggi nessuna di queste proteine è stata isolata in forma cristallina e gli studi di

correlazione struttura-funzione fino ad ora disponibili sono stati effettuati esclusivamente mediante tecniche computazionali predittive.

Questo lavoro di tesi è stato progettato al fine di verificare il livello di espressione in cellule umane normali e trasformate delle due varianti trascrizionali CLU1 (NM_001831) e CLU2 (NM_203339), e di testare l'eventuale presenza nelle stesse cellule del messaggero alternativo proposto da Leskov. Questa analisi è stata effettuata tramite RT-PCR impiegando come template il cDNA ottenuto a partire dall'RNA totale estratto dai vari tipi cellulari e coppie di primer specifici in grado di discriminare CLU1 da CLU2. La successiva determinazione del peso molecolare degli ampliconi ottenuti ha permesso di rilevare la presenza (o l'assenza) dell'esone 2 e quindi eventuali bande riconducibili al messaggero alternativo descritto da Leskov. I prodotti di RT-PCR ottenuti possiedono il peso molecolare atteso per l'Isoforma 1 e l'Isoforma 2, quindi non è stata rilevata la presenza di particolari ampliconi derivati dallo splicing alternativo descritto da Leskov, né nelle stesse cellule MCF7 utilizzate dall'autore, né in nessuna delle altre linee cellulare analizzate. Dato che l'esistenza di questo trascritto alternativo in seguito non è mai stata confermata da altri autori, è necessario prendere seriamente in considerazione la possibilità che possa trattarsi di un artefatto sperimentale (Andersen *et al.*,2007; Cochrane *et al.*,2007; Schepeler *et al.*,2007; Rizzi *et al.*,2009). Da questa analisi è emersa inoltre una differente espressione delle due varianti trascrizionali di CLU a seconda del tipo cellulare preso in considerazione. Infatti, nella linea cellulare di fibroblasti fetali normali WI38 e nella linea di cellule di epitelio prostatico normale immortalizzato PNT1A, sono stati rilevati livelli di espressione pressoché identici per le due isoforme di Clusterina. Il pattern di espressione delle due varianti trascrizionali è invece differente in cellule trasformate. L'Isoforma 1 è

costitutivamente espressa in tutte le linee analizzate, mentre l'Isoforma 2 risulta assente (o presente a livelli non rilevabili) in tutte le linee tumorali prese in considerazione. L'espressione dell'Isoforma 2 è quindi correlata in modo specifico agli eventi coinvolti nella trasformazione neoplastica (Rizzi *et al.*, 2009). I dati emersi da questo primo studio ci hanno portato a ipotizzare una regolazione differenziale per questi due trascritti che potrebbe derivare dalla presenza di regioni promotrici e di siti d'inizio trascrizione (TSS) differenti che coinvolgono meccanismi di tipo epigenetico. Un'analisi "in silico" della regione genomica prossimale al gene CLU ha effettivamente rilevato la presenza di TSS e regioni promotrici differenti per le due isoforme; individuando anche due isole CpG, potenzialmente oggetto di metilazione, situate appena prima e appena dopo il sito di inizio trascrizione di CLU1. Inoltre, in letteratura, sono riportati diversi lavori che propongono una regolazione di CLU per via epigenetica (Lodygin *et al.*, 2005; Rauhala *et al.*, 2008; Hellebrekers *et al.*, 2007; Lund *et al.*, 2006; Suuronen *et al.*, 2007; Nuutinen *et al.*, 2005); ma in nessuno di questi è stato preso in considerazione come possa eventualmente influire in modo differenziale sulla trascrizione delle due isoforme. Perciò si è proceduto sottoponendo cellule di cancro prostatico all'azione di farmaci epigenetici al fine di valutare gli effetti da essi indotti sull'espressione e sulla localizzazione cellulare di Clusterina. Le linee cellulari tumorali di prostata PC3 e DU145 sono state trattate con tricostatina A (TSA), un inibitore delle istone deacetilasi (HDAC) di classe I e II e/o con 5-aza-2'-deossicitidina (5AzadC), un inibitore delle DNA metiltransferasi (DNMT). L'espressione delle due isoforme di CLU è stata quindi valutata attraverso RT-PCR, seguendo la procedura precedentemente descritta. Questa analisi ha messo in evidenza la capacità di questi composti, soprattutto quando utilizzati in combinazione, di indurre la riattivazione dell'espressione di CLU2,

assente in condizioni standard, in entrambe le linee cellulari tumorali. L'effetto dei farmaci epigenetici è stato determinato anche a livello del pattern di espressione proteica di CLU. I saggi Western Blot hanno mostrato come, in entrambe le linee cellulari, 5AzadC e TSA, specialmente quando somministrati insieme, siano in grado di indurre un incremento della produzione del precursore e della forma intracellulare pronta per la secrezione di Clusterina, e coerentemente, un aumento di sCLU nei mezzi di coltura, rispetto alle stesse cellule mantenute in condizioni standard. Inoltre, nella linea cellulare DU145, in seguito alla somministrazione dei farmaci epigenetici, compare una banda di 45 kDa. Questa banda, la cui intensità aumenta quando 5-AzadC e TSA agiscono in combinazione, è attribuibile alla forma troncata della proteina a localizzazione nucleare e con funzione proapoptotica. Anche l'analisi immunocitochimica ha rilevato un aumento del segnale specifico di CLU in cellule sottoposte al trattamento, soprattutto quando combinato, rispetto ai controlli. La localizzazione di CLU però appare diversa nelle due linee cellulari: in PC3 essa si mantiene a livello citoplasmatico, mentre in DU145, la proteina si trova principalmente a livello perinucleare, quando alle cellule vengono somministrate separatamente 5AzadC e TSA, e tende ad accumularsi nel nucleo di cellule prossime alla morte, nella condizione di trattamento combinato con i due farmaci. Questo dato conferma quanto ottenuto con l'analisi WB. La morfologia delle linee cellulari tumorali PC3 e DU145 è stata osservata attraverso microscopia in contrasto di fase, prima e dopo la somministrazione dei farmaci epigenetici. Entrambe le linee cellulari tendono a perdere la propria morfologia caratteristica in seguito ai trattamenti. Questo fenomeno è decisamente più marcato nella linea DU145, dove l'arrotondamento ed il successivo distacco delle cellule dal supporto di crescita (Anoikis) è maggiormente evidente. Inoltre, in DU145 ma non in PC3, nel caso di somministrazione combinata di 5AzadC e TSA,

si osserva una notevole frammentazione cellulare, senza rilascio di citoplasma, che porta alla formazione di corpi apoptotici. Questo fenomeno, denominato "blebbing", si verifica quando nelle cellule è stato innescato il processo di morte programmata per apoptosi. Per verificare questa ipotesi, il profilo di espressione dell'enzima Poli (ADP-Ribosio) polimerasi-1 (PARP-1) è stato valutato tramite WB, in entrambe le linee cellulari di cancro prostatico, nelle diverse condizioni sperimentali d'interesse. Questa proteina costituisce il principale membro della famiglia di enzimi PARP che catalizzano il trasferimento di ADP-ribosio dal NAD ai gruppi carbossilici di varie proteine nucleari. PARP-1 è attivata in risposta a danni al DNA e riveste un ruolo importante nei meccanismi di "base excision repair" e apoptosi. In particolare, durante il processo apoptotico, il precursore di PARP-1 viene clivato dalla caspasi 3 o 7, generando il frammento proteico corrispondente alla PARP1 attivata. Le procaspasi 3 e 7, a monte, sono attivate a loro volta dalle caspasi iniziatrici.

In PC3, in tutte le condizioni analizzate è presente esclusivamente il precursore inattivo di PARP1, e la forma inattiva (pro-caspasi) delle caspasi 3 e 7, mentre in DU145, a conferma di quanto osservato a livello morfologico, nella condizione di trattamento combinato con 5AzadC e TSA è presente la banda corrispondente alla PARP-1 clivata, e quindi attivata ad opera delle caspasi 3 e 7, coerentemente presenti anch'esse nella loro forma attiva.

Il DNA genomico di cellule normali WI38 e cellule tumorali di prostata è stato analizzato tramite Methylation Specific PCR (MSP) per verificare lo stato di metilazione delle isole CpG individuate nella zona regolatrice del gene *CLU*. Nella linea cellulare normale queste sequenze non sono metilate, mentre lo sono nelle cellule tumorali. La metilazione risulta completa in PC3 e parziale in DU145. Questo dato è coerente con l'osservazione che cellule WI38, cresciute in condizioni standard fino al raggiungimento di una confluenza di circa l'80%,

producono e secernono quantità di CLU più elevate di quelle riscontrate nelle cellule trasformate.

In seguito, sono state valutate eventuali variazioni nello stato di metilazione di tali regioni a seguito del trattamento di cellule PC3 e DU145 con farmaci epigenetici. In entrambe le linee cellulari, non sono stati individuati cambiamenti rilevanti indotti da 5AzadC nello stato di metilazione delle isole CpG, né quando somministrata singolarmente, né quando utilizzata in combinazione con TSA. Questo risultato è giustificabile mediante diverse ipotesi. In primo luogo è necessario ricordare che la 5AzadC non è un agente demetilante diretto ma un composto in grado di interferire sull'attività delle DNMT. Il meccanismo catalitico di questi enzimi implica la formazione di un legame covalente fra un residuo di cisteina presente nel sito attivo e il carbonio 6 (C6) della citosina presente nella sequenza di DNA. Il meccanismo attraverso il quale questi enzimi catalizzano la metilazione del DNA è stato ben caratterizzato e prevede il trasferimento di un gruppo metile dal cofattore S-adenosil metionina (SAM) al carbonio 5 della citosina con la conseguente formazione di un legame covalente C-C (Patra *et al.*, 2008). Metilazione e demetilazione del DNA sono due reazioni chimiche distinte e concettualmente opposte ed il meccanismo alla base della demetilazione non è ancora stato definito con chiarezza. Recentemente Patra e Bettuzzi hanno proposto un possibile meccanismo attraverso il quale la 5-aza-2'deossicitidina sarebbe in grado di inattivare le DNA metiltransferasi, il quale prevede la formazione di un addotto stabile DNMT-5AzadC mediato da un legame covalente fra il gruppo tiolico della cisteina presente nel sito attivo dell'enzima e il carbonio 6 dell'analogo della citosina (Patra e Bettuzzi, 2009). Il fatto che l'enzima si trovi intrappolato in questo addotto preverrebbe la conservazione della metilazione sul DNA durante la replicazione portando alla formazione di un filamento

complementare ipometilato. Gli autori propongono inoltre che le DNTM tendano a legarsi avidamente a sezioni di DNA che, avendo incorporato al posto della citosina la 5AzadC, possiedono una struttura anomala, e che questo fatto impedisca all'enzima di completare il suo ciclo catalitico.

In secondo luogo non è possibile escludere che le isole CpG individuate non siano in realtà quelle coinvolte nella riattivazione epigenetica di *CLU* osservata, le quali potrebbero trovarsi anche notevolmente distanti dalla regione genomica valutata. Infatti, nel ratto ad esempio, è stata individuata una isola CpG localizzata oltre 14 kb a monte del gene *CLU*, che nella linea cellulare di fibroblasti FE-8 trasformati con *HRAS* risulta ipermetilata e coinvolta nella riattivazione di clusterina indotta dalla somministrazione di farmaci epigenetici (Lund *et al.*, 2006).

Inoltre è noto che inibitori delle DNA metiltrasferasi (DNMT) e delle istone deacetilasi (HDAC) possono agire sinergicamente e riattivare geni oncosoppressori epigeneticamente silenziati (Cameron *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2006) revertendo le modificazioni degli istoni a livello del promotore. Diversi studi suggeriscono che la metilazione delle isole CpG non sia la causa primaria dell'inattivazione della trascrizione, ma che contribuisca a mantenere silenziati a lungo termine geni già repressi da altri meccanismi, mentre la deacetilazione di H3 e la perdita della metilazione sulla sua lisina 4 sembrano essere modificazioni epigenetiche più dinamiche in grado di intervenire nelle prime fasi del silenziamento genico (Tamaru e Selker, 2001; Bachman *et al.*, 2003). Un meccanismo di questo tipo è già stato ipotizzato per *CLU* in particolari tipi cellulari (Lund *et al.*, 2006; Hellebrekers *et al.*, 2007). Inoltre le DNMT, a parte la loro attività metiltransferasica, svolgono ruoli addizionali nel silenziamento genico. Infatti questi enzimi esibiscono funzioni repressive indipendenti dalla metilazione agendo ad esempio essi stessi come

repressori trascrizionali o fungendo da ancoraggio per le istone metiltransferasi (Lehnertz *et al.*, 2003) e le HDAC (Fuks *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Rountree *et al.*, 2000). Quindi la 5AzadC, intrappolando le DNMT sul DNA, può agire inibendo l'attività sia metilazione-dipendente che indipendente di questi enzimi.

Infine, responsabile della riattivazione indiretta di CLU potrebbe essere la demetilazione di promotori di altri geni, come per esempio fattori di trascrizione.

Attualmente è in corso l'ottimizzazione in PC3 e DU145 trattate con 5AzadC e TSA di esperimenti di Chromatin Immuno Precipitation (ChIP) con anticorpi contro l'istone H3 acetilato sulla lisina 9 e l'istone H3 di- e tri-metilato sulla lisina 4 al fine di consolidare l'ipotesi di un arricchimento di queste proteine a livello delle regioni regolatrici CLU, dovuto al loro coinvolgimento nella riattivazione epigenetica di questo gene.

Nel complesso i dati raccolti evidenziano che, in cellule tumorali di prostata, è presente una down-regolazione dell'espressione di CLU, particolarmente marcata a livello della trascrizione dell'Isoforma 2, la quale appare completamente repressa. Questo dato supporta i nostri risultati precedenti che mostrano una down regolazione di CLU nel cancro della prostata (Bettuzzi *et al.*, 2000; Scaltriti *et al.*, 2004c; Rizzi *et al.*, 2008). Da questo lavoro di tesi è emerso che in linee di cancro prostatico il trattamento con questi farmaci epigenetici induce un rimodellamento della cromatina a livello delle regione promotrici di CLU che comporta:

- 1) la riattivazione dell'Isoforma 2, la cui espressione è risultata essere repressa in condizioni normali
- 2) un incremento nella produzione e nella secrezione di sCLU
- 3) la comparsa in DU145 di nCLU, che si localizza a livello nucleare inducendo queste cellule ad intraprendere il pathway di morte programmata per apoptosi, confermando nostri dati precedenti che

Discussione e conclusioni

hanno dimostrato il ruolo pro-apoptotico della sua forma nucleare (Caccamo *et al.*, 2004; Caccamo *et al.*, 2005; Caccamo *et al.*, 2006; Scaltriti *et al.*, 2004a).

Questi dati suggeriscono che l'espressione di CLU possa essere riattivata in cellule trasformate mediante farmaci epigenetici, ed inoltre supportano i nostri dati precedenti che ci hanno permesso di suggerire che CLU sia un importante oncosoppressore del cancro prostatico (Bettuzzi *et al.*, 2009).

Concludendo, i risultati ottenuti nel loro insieme portano ad ipotizzare che, alla base del silenziamento genico di CLU e della trasformazione della cellula epiteliale prostatica, vi siano meccanismi di regolazione epigenetica differenziali che agiscono probabilmente a livello di regioni genomiche diverse e che la comprensione del meccanismo che regola questo fenomeno possa portare allo sviluppo di nuove terapie, alternative ed efficaci, per questa malattia neoplastica di enorme rilievo sociale nei paesi occidentali.

BIBLIOGRAFIA

Bonkhoff H, Remberger K (1996). **Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model.** *Prostate.* 28(2):98-106.

Lalani el-N, Laniado ME, Abel PD (1997). **Molecular and cellular biology of prostate cancer.** *Cancer Metastasis Rev.* 16(1-2):29-66.

Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA (1996). **Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development.** *Acta Anat (Basel).* 155(1):63-72.

Chung LW, Davies R (1996). **Prostate epithelial differentiation is dictated by its surrounding stroma.** *Mol Biol Rep.* 23(1):13-9.

Smith, MR., Kantoff, PW. (2001). **Molecular Biology of Prostate Cancer. The molecular basis of cancer.**

Hall JA, Maitland NJ, Stower M, Lang SH (2002). **Primary prostate stromal cells modulate the morphology and migration of primary prostate epithelial cells in type 1 collagen gels.** *Cancer Res.* 62(1):58-62.

McNeal JE (1988). **Normal histology of the prostate.** *Am J Surg Pathol.* 12(8):619-33.

Silverberg E (1987). **Statistical and epidemiologic data on urologic cancer.** *Cancer.* 60(3):692-717.

Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, Cooner WH (1992). **Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer.** *J Urol.* 147(3-2):815-6.

Carter HB, Pearson JD (1997). **Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen.** *Urol Clin North Am.* 24(2):333-8.

Gleason, DF (1966). **Classification of prostatic carcinoma.** *Cancer Chemother Rep.* 50:125-128.

Dawson NA, (2003). **Point: It's never too soon.** *Can J Urol.* 10(6):2036-7.

Houston B, Chisholm GD, Habib FK (1985). **Evidence that human prostatic 5 alpha-reductase is located exclusively in the nucleus.** *FEBS Lett.* 185(2):231-5.

Isaacs JT, Coffey DS (1981). **Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma.** *Cancer Res.* 41(12-1):5070-5.

Shaffer DR, Scher HI (2003). **Prostate cancer: a dynamic illness with shifting targets.** *Lancet Oncol.* 4(7):407-14.

Reed JC (2002). **Apoptosis-based therapies.** *Nat Rev Drug Discov.* 1(2):111-21.

De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI, Isaacs WB, Nelson WG (2004). **Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment.** *J Cell Biochem.* 2004 91(3):459-77.

Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, Timme TL, Yang G, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC (1995). **Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer.** *Clin Cancer Res.* 1(10):1111-8.

Meyers FJ, Gumerlock PH, Chi SG, Borchers H, Deitch AD, deVere White RW (1998). **Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors.** *Cancer.* 83(12):2534-9.

McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML (1992). **Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer.** *Cancer Res.* 52(24):6940-4.

Reed JC (1998). **Bcl-2 family proteins.** *Oncogene.* 17(25):3225-36.

Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC (1996). **Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers.** *Am J Pathol.* 148(5):1567-76.

Catz SD, Johnson JL (2001). **Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer.** *Oncogene*. 20(50):7342-51.

Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhlin OW, Cohen MB (2004). **Death receptor-induced cell death in prostate cancer.** *J Cell Biochem*. 91(1):70-99.

Gurova KV, Roklin OW, Krivokrysenko VI, Chumakov PM, Cohen MB, Feinstein E, Gudkov AV (2002). **Expression of prostate specific antigen (PSA) is negatively regulated by p53.** *Oncogene*. 21(1):153-7.

Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV (2002). **The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells.** *J Cell Sci*. 115(1):141-51.

Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gélinas C, Rabson AB (2002). **Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells.** *Prostate*. 52(3):183-200.

Dong JT, Sipe TW, Hyytinen ER, Li CL, Heise C, McClintock DE, Grant CD, Chung LW, Frierson HF Jr (1998). **PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate.** *Oncogene*. 17(15):1979-82.

Bookstein, R. (2001). **Tumor suppressor genes in prostate cancer.** In: Chung, LW., Isaacs, WB., Simons JW., eds. Prostate cancer: biology, genetics, and the new therapeutics. *Totowa, NJ: Humana Press* 61-93

Wang SI, Parsons R, Ittmann M (1998). **Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas.** *Clin Cancer Res*. 4(3):811-5.

Liotta LA, Kohn E (2004). **Anoikis: cancer and the homeless cell.** *Nature*. 430(7003):973-4.

Cantley LC, Neel BG (1999). **New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8):4240-5.

Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D (1997). **Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer.** *Cancer Res.* 57(22):4997-5000.

Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS (2004). **Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB.** *Nature.* 430(7003):1034-9.

Speliotes EK, Uren A, Vaux D, Horvitz HR (2000). **The survivin-like C. elegans BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone.** *Mol Cell.* 6(2):211-23.

Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, Lithgow T (1999). **Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(18):10170-5.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (1998). **Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.** *Nature.* 396(6711):580-4.

Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T (1999). **Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(4):1457-62.

Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY (2001). **Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin.** *Prostate.* 48(1):7-15.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997). **A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** *Nat Med.* (8):917-21.

McEleny KR, Watson RW, Coffey RN, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM (2002). **Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines.** *Prostate.* 51(2):133-40.

Dveraux QL, Reed JC (1999). **IAP family proteins-suppressor of apoptosis.** *Genes & Dev.* 13:239-252.

Russell P, Nurse P (1986). **cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast.** *Cell.* 45(1):145-53.

Okada H, Mak TW (2004). **Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells.** *Nat Rev Cancer.* 4(8):592-603.

Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC (1999). **Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function.** *Nat Cell Biol.* 1(8):461-6.

Fritz IB, Burdzy K, Sétchell B, Blaschuk O (1983). **Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro.** *Biol Reprod.* 28(5):1173-88.

Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB (1983). **Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid.** *J Biol Chem.* 258(12):7714-20.

Blaschuk O, Fritz IB (1984). **Isoelectric forms of clusterin isolated from ram rete testis fluid and from secretions of primary cultures of ram and rat Sertoli-cell-enriched preparations.** *Can J Biochem Cell Biol.* 62(6):456-61.

Tung PS, Fritz IB (1985). **Immunolocalization of clusterin in the ram testis, rete testis, and excurrent ducts.** *Biol Reprod.* 33(1):177-86.

Choi NH, Mazda T, Tomita M (1989). **A serum protein SP40,40 modulates the formation of membrane attack complex of complement on erythrocytes.** *Mol Immunol.* 26(9):835-40.

de Silva HV, Stuart WD, Park YB, Mao SJ, Gil CM, Wetterau JR, Busch SJ, Harmony JA (1990). **Purification and characterization of apolipoprotein J.** *J Biol Chem.* 265(24):14292-7.

Fischer-Colbrie R, Zangerle R, Frischenschlager I, Weber A, Winkler H (1984). **Isolation and immunological characterization of a glycoprotein from adrenal chromaffin granules.** *J Neurochem.* 42(4):1008-16.

James RW, Hochstrasser AC, Borghini I, Martin B, Pometta D, Hochstrasser D (1991). **Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytotoxicity.** *Arterioscler Thromb.* 11(3):645-52.

Rosenberg ME, Silkensen J (1995). **Clusterin: Physiologic and Pathophysiologic considerations.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 633-645.

Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M (1986). **Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate.** *Prostate.* 8(1):25-36.

Bettuzzi S, Hiipakka RA, Gilna P, Liao ST (1989). **Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis.** *Biochem J.* 257(1):293-6.

Collard MW, Griswold MD (1987). **Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells.** *Biochemistry.* 26(12):3297-303.

Cheng CY, Chen CL, Feng ZM, Marshall A, Bardin CW (1988). **Rat clusterin isolated from primary Sertoli cell-enriched culture medium is sulfated glycoprotein-2 (SGP-2).** *Biochem Biophys Res Commun.* 155(1):398-404.

Jenne DE, Tschopp J (1989). **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(18):7123-7.

Jenne DE, Tschopp J (1992). **Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein.** *Trends Biochem Sci.* 17(4):154-9.

Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, Grzeschik KH, Ingletti C, Corti A, Sichel G (1991). **The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8.** *Genomics.* 10(1):151-6.

Slawin K, Sawczuk IS, Olsson CA, Buttyan R (1990). **Chromosomal assignment of the human homologue encoding SGP-2.** *Biochem Biophys Res Commun.* 172(1):160-4.

Tobe T, Minoshima S, Yamase S, Choi NH, Tomita M, Shimizu N (1991). **Assignment of a human serum glycoprotein SP-40,40 gene (CLI) to chromosome 8.** *Cytogenet Cell Genet.* 57(4):193-5.

Fink TM, Zimmer M, Tschopp J, Etienne J, Jenne DE, Lichter P (1993). **Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene.** *Genomics.* 16(2):526-8.

Dietzsch E, Murphy BF, Kirschbaum L, Walker ID, Garson OM (1992). **Regional localization of the gene for clusterin (SP-40,40; gene symbol CLI) to human chromosome 8p12-->p21.** *Cytogenet Cell Genet.* 61(3):178-9.

Herault Y, Chatelain G, Brun G, and Michel D (1992). **V-src-induced-transcription of the avian clusterin gene.** *Nuc. Acids Res.* 20: 6377-6383.

Wong P, Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Léger J, Wang C, and Tenniswood M (1993). **Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis.** *J. biol. Chem.* 268: 5021-5031.

Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M (1994). **Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration.** *Eur J Biochem.* 221(3):917-25.

Birkenmeier EH, Letts VA, Frankel WN, Magenheimer BS, Calvet JP (1993). **Sulfated glycoprotein-2 (Sgp-2) maps to mouse chromosome 14.** *Mamm Genome.* 4(2):131-2.

Goldner-Sauvé A, Szpirer C, Szpirer J, Levan G, Gasser DL (1991). **Chromosome assignments of the genes for glucocorticoid receptor, myelin basic protein, leukocyte common antigen, and TRPM2 in the rat.** *Biochem Genet.* 29(5-6):275-86.

Michel D, Chatelain G, North S, Brun G (1997). **Stress-induced transcription of the Clusterin/ApoJ gene.** *Biochem. J.* 328: 45-50.

Jin G, Howe PH (1997). **Regulation of Clusterin gene expression by transforming growth factor β .** *J. Biol. Chem.* 272: 26620–26626.

Gutacker C, Klock G, Diel P, and Koch-Brandt C (1999). **Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate Clusterin gene expression in PC12 cells.** *Biochem. J.* 339: 759–766.

Jones SE, Jomary C (2002). **Clusterin.** *Int J Biochem Cell Biol.* 34(5):427-431.

Rosemblit N, Chen CL (1994). **Regulators of the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements.** *J. Molec. Endocrin.* 13: 69-76.

Michel D, Chatelain G, Herault Y, Brun G (1995). **The expression of the avian Clusterin gene can be driven by two alternative promoters with distinct regulatory elements.** *Eur. J. Biochem.* 229: 215–223.

Cochrane DR, Wang Z, Muramaki M, Gleave ME, Nelson CC (2007). **Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells.** *J Biol Chem.* 282(4):2278-87.

Andersen CL, Schepeler T, Thorsen K, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Aaltonen LA, Laurberg S, Ørntoft TF (2007). **Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer.** *Mol Cell Proteomics.* 6(6):1039-48.

Lee C, Atanelov L, Modrek B, Xing Y (2003). **ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project.** *Nucleic Acids Res.* 31(1):101-5.

Rizzi F, Coletta M, Bettuzzi S (2009). **Chapter 2: Clusterin (CLU): From one gene and two transcripts to many proteins.** *Adv Cancer Res.* 104:9-23.

Nakai K, Horton P (2007). **Computational prediction of subcellular localization.** *Methods Mol Biol.* 390:429-66.

Suzuki T, Kashiwagi K, Igarashi K (1993). **Polyamine regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase synthesis through the 5'-untranslated region of its mRNA.** *Biochem Biophys Res Commun.* 192(2):627-34.

Nishimura K, Kashiwagi K, Matsuda Y, Jänne OA, Igarashi K (1999). **Gene structure and chromosomal localization of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase.** *Gene*. 238(2):343-50.

Schlüter G, Boinska D, Nieman-Seyde SC (2000). **Evidence for translational repression of the SOCS-1 major open reading frame by an upstream open reading frame.** *Biochem Biophys Res Commun*. 268(2):255-61.

Peng X, Mehta RG, Tonetti DA, Christov K (2005). **Identification of novel RARbeta2 transcript variants with short 5'-UTRs in normal and cancerous breast epithelial cells.** *Oncogene*. 24(7):1296-301.

Harigai M, Miyashita T, Hanada M, Reed JC (1996). **A cis-acting element in the BCL-2 gene controls expression through translational mechanisms.** *Oncogene*. 12(6):1369-74.

Scaltriti M, Santamaria A, Paciucci R, Bettuzzi S (2004a). **Intracellular clusterin induces G2-M phase arrest and cell death in PC-3 prostate cancer cells.** *Cancer Res*. 64(17): 6174-82.

Leskov KS, Klovov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA (2003). **Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein.** *J Biol Chem*. 278(13): 11590-600.

Schepeler T, Mansilla F, Christensen LL, Orntoft TF, Andersen CL (2007). **Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling.** *J Mol Signal*. 2:6.

Choi-Miura NH, Takahashi Y, Nakano Y, Tobe T, Tomita M (1992). **Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (Apolipoprotein J).** *J Biochem*. 112(4): 557-61.

Parodi AJ (2000). **Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation.** *Biochem J*. 348: Pt 1:1-13.

Roth J, Berger EG (1982). **Immunocytochemical localisation of galacto-syltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae.** *J. Cell Biol*. 93: 223-229.

Moremen K, Touster O (1985). **Biosynthesis and modification of Golgi mannosidase II in HeLa cells.** *J. Biol. Chem.* 260: 6654-6662.

Lakins J, Bennet SAL, Chen J-H, Arnold JM, Morrissey C, Wong P, O'Sullivan J, Tenniswood M (1998). **Clusterin is altered during apoptosis in the regressing ventral rat prostate.** *J. Biol. Chem.* 273(43): 27887-27895.

O'Sullivan J, Whyte L, Drake J, Tenniswood M (2003). **Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis.** *Cell Death Differ.* 10(8): 914-27.

Kapron JT, Hilliard GM, Lakins JN, Tenniswood MP, West KA, Carr SA, Crabb JW (1997). **Identification and characterization of glycosylation sites in human serum Clusterin.** *Protein Sci.* 6: 2120-2133.

Bailey RW, Dunker AK, Brown CJ, Garner EC, Griswold MD (2001). **Clusterin, a Binding Protein with a Molten Globule-like Region.** *Biochemistry* 40(39): 11828 -11840.

Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK (2001). **Sequence complexity of disordered protein.** *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 42: 38-48.

Wilson MR, Easterbrook-Smith SB (2000). **Clusterin is a secreted mammalian chaperon.** *Trends Biochem. Sci.* 25(3): 95-98.

Rizzi F, Bettuzzi S (2010). **The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis.** *Endocr Relat Cancer.* 17(1):R1-17.

Lupas A (1991). **Predicting coiled-coils from protein sequences.** *Science* 252: 1162-1164.

Poon S, Treweek TM, Wilson MR, Easterbrook-Smith SB, Carver JA (2002a). **Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway.** *FEBS Lett.* 513: 259-266.

Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, Carver JA, Wilson MR (2000). **Clusterin is an ATP-independent chaperone with very**

broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39: 15953–15960.

De Silva HV, Harmony JA, Stuart WD, Gil CM, Robbins J (1990). **Apolipoprotein J: structure and tissue distribution.** *Biochemistry* 29 (22):5380–5389

Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, Becker G, May PC (1996). **Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity.** *J Neurochem.* 67(3):1324-7.

Kirschbaum L, Sharpe JA, Murphy B, d'Apice AJ, Classon B, Hudson P, Walker ID (1989). **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(3):711-8.

Park DC, Yeo SG, Wilson MR, Yerbury JJ, Kwong J, Welch WR, Choi YK, Birrer MJ, Mok SC, Wong KK (2008). **Clusterin interacts with Paclitaxel and confer Paclitaxel resistance in ovarian cancer.** *Neoplasia.* 10(9):964-72.

Rosenberg ME, Girton R, Finkel D, Chmielewski D, Barrie A 3rd, Witte DP, Zhu G, Bissler JJ, Harmony JA, Aronow BJ (2002). **Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging.** *Mol Cell Biol.* 22(6):1893-902.

Poon S, Rybchyn MS, Easterbrook-Smith SB, Carver JA, Pankhurst GJ, Wilson MR (2002b). **Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin.** *J Biol Chem.* 277(42):39532-40.

Hochgrebe T, Pankhurst GJ, Wilce J, Easterbrook-Smith SB (2000). **pH-dependent changes in the in vitro ligand-binding properties and structure of human clusterin.** *Biochemistry* 39: 1411-1419.

Carver JA, Lindner RA, Lyon C, Canet D, Dobson CM, Redfield C (2002). **The interaction of the molecular chaperone alpha-crystallin with unfolding alpha-lactalbumin: a structural and kinetic spectroscopic study.** *J. Mol. Biol.* 318: 812-827.

Bova MP, Ding LL, Horwitz J, Fung BKK (1997). **Subunit exchange of alphaA-crystallin.** *J. Biol. Chem.* 272: 29511-29517.

Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen SX, Saibil HR, Buchner J (1999). **Hsp26: a temperature-regulated chaperone.** *EMBO J.* 18: 6744-6751.

Lindner RA, Kapur A, Carver JA (1997). **The interaction of the molecular chaperone, alpha-crystallin, with molten globule states of bovine alpha-lactalbumin.** *J. Biol. Chem.* 272: 27722-27729.

Lindner RA, Kapur A, Mariani M, Titmuss SJ, Carter JA (1998). **Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action.** *Eur. J. Biochem.* 258: 170-183.

Lindner RA, Treweek TM, Carver JA (2001). **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.

Tsuruta JK, Wong K, Fritz IB, Griswold MD (1990). **Structural analysis of sulphated glycoprotein 2 from amino acid sequence. Relationship to clusterin and serum protein 40,40.** *Biochem. J.* 268: 571-578.

Humphreys D, Carver J, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR (1999). **Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins.** *J. Biol. Chem.* 274: 6875-6881.

Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, Wilson MR (2007). **The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures.** *FASEB J.* 21(10):2312-22.

Tang H, Fu Y, Cui Y, He Y, Zeng X, Ploplis VA, Castellino FJ, Luo Y (2009). **Fibrinogen has chaperone-like activity.** *Biochem Biophys Res Commun.* 378(3):662-7.

Marini I, Moschini R, Del Corso A, Mura U (2005). **Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with alpha-crystallin.** *Cell Mol Life* 62(24):3092-9.

Wood SJ, Chan W, Wetzel R (1996). **Seeding of A beta fibril formation is inhibited by all three isoforms of apolipoprotein E.** *Biochemistry.* 35(38):12623-8.

Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Wilson MR (2005a). **Quality control of protein folding in extracellular space.** *EMBO Rep.* 6(12):1131-6.

French K, Yerbury JJ, Wilson MR (2008). **Protease activation of alpha2-macroglobulin modulates a chaperone-like action with broad specificity.** *Biochemistry.* 47(4):1176-85.

Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK (2002). **CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma.** *Int J Biochem Cell Biol.* 34(4):309-14

Wyatt RA, Wilson RM (2009a). **Chapter 6: The chaperone action of Clusterin and its putative role in quality control of extracellular protein folding.** *Adv Cancer Res.* 104:89-114

Yerbury JJ, Rybchyn MS, Easterbrook-Smith SB, Henriques C, Wilson MR (2005b). **The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin.** *Biochemistry.* 44(32):10914-25.

Adler V, Kryukov V (2007). **Serum macroglobulin induces prion protein transition.** *Neurochem. J.* 1:43-52.

Ecroyd H, Belghazi M, Dacheux JL, Gatti JL (2005). **The epididymal soluble prion protein forms a high-molecular-mass complex in association with hydrophobic proteins.** *Biochem J.* 392(1):211-9.

Wyatt RA, Wilson RM (2010). **Identification of Human Plasma Proteins as Major Clients for the Extracellular Chaperone Clusterin.** *J. Biol. Chem.* 285(6):3532-3539.

Wyatt RA, Wilson RM (2009b). **Structural Characterization of Clusterin-Chaperone Client Protein Complexes.** *J. Biol. Chem.* 284(33):21920-21927.

Reddy KB, Jin G, Karode MC, Harmony JA, Howe PH (1996). **Transforming growth factor beta (TGF beta)-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells.** *Biochemistry.* 35(19):6157-63.

Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, Kinsella TJ, Boothman DA (2000). **Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(11):5907-12.

Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Scorcioni F, Astancolle S, Mangiola M, Bettuzzi S. (2004). **Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin.** *Biochem J.* 382, 157-168.

Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Corti A, Corvetta D, Sala A, Bettuzzi S (2005). **Ca²⁺ depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells.** *Cell Death Differ.* 12(1):101-4.

Caccamo, AE., Desenzani, S., Belloni, L., Borghetti, AF., Bettuzzi, S. (2006). **Nuclear clusterin accumulation during heat shock response: implications for cell survival and thermo-tolerance induction in immortalized and prostate cancer cells.** *J Cell Physiol.* 207(1):208-19.

Moretti RM, Marelli MM, Mai S, Cariboni A, Scaltriti M, Bettuzzi S, Limonta P (2007). **Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis.** *Cancer Res.* 67(21):10325-33.

Nizard P, Tetley S, Le Dréan Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, Michel D (2007). **Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol.** *Traffic.* 8(5):554-65.

Kang SW, Shin YJ, Shim YJ, Jeong SY, Park IS, Min BH (2005). **Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells.** *Exp Cell Res.* 309(2):305-15.

Scaltriti M, Bettuzzi S, Sharrard RM, Caporali A, Caccamo AE, Maitland NJ (2004b). **Clusterin over-expression in both malignant and non-malignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis.** *Br J Cancer.* 91(10):1842-50.

Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Scorcioni F, Candiano G, Mangiola M, and Bettuzzi S, (2003). **Nuclear traslocation of a clusterin isoform is associated with induction of anoikis in SV40-immortalized Human prostste epithelial cell.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010: 514-519.

Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J (2006). **Challenge and promise: roles for clusterin**

in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ.* 13(1):12-9.

Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES (2004). **Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein J gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress.** *Cancer Res.* 64(5):1834-42.

Gleave M, Miyake H (2005). **Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer.** *World J Urol.* 23(1):38-46.

Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M, Corti A (2002). **Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalised human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression.** *Oncogene.* 21(27):4328-34.

Cervellera M, Raschella G, Santilli G, Tanno B, Ventura A, Mancini C, Seignani C, Calabretta B, Sala A (2000). **Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin), by B-Myb.** *J Biol Chem.* 275(28):21055-60.

Santilli G, Aronow BJ, Sala A (2003). **Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for I κ B expression and regulation of NF- κ B activity.** *J Biol Chem.* 278(40):38214-9.

Sawada M, Hayes P, Matsuyama S (2003). **Cytoprotective membrane permeable peptides designed from the Bax-binding domain of KU-70.** *Nat Cell Biol.* 5(4):352-7.

Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Mancina R, Comerci A, Muratori M, Scaltriti M, Vannelli GB, Smiroldo S, Mariani R, Villari D, Bettuzzi S, Serio M, Adorini L, Maggi M (2003). **Inhibition of spontaneous and androgen-induced prostate growth by a non hypercalcemic calcitriol analogue.** *Endocrinology.* 144(7):3046-57.

Jin G, Howe PH (1999). **Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos.** *Eur J Biochem.* 263(2):534-42.

Klock G, Storch S, Rickert J, Gutacker C, Koch-Brandt C (1998). **Differential regulation of the clusterin gene by Ha-Ras and c-myc oncogenes during apoptosis.** *J Cell Physiol.* 177(4):593-605.

Tchernitsa OI, Sers C, Zuber J, Hinzmann B, Grips M, Schramme A, Lund P, Schwendel A, Rosenthal A, Schäfer R (2004). **Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells.** *Oncogene.* 23(26):4536-55.

Kyprianou N, English HF, Davidson NE, Isaacs JT (1991). **Programmed cell death during regression of MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation.** *Cancer Res.* 51(1):162-6.

Sala A, Bettuzzi S, Pucci S, Chayka O, Dews M, Thomas-Tikhonenko A (2009). **Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis.** *Adv Cancer Res.* 105:115-32.

Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N (2002). **Expression of clusterin in human pancreatic cancer.** *Pancreas.* 25(3):234-8.

Thomas-Tikhonenko A, Viard-Leveugle I, Dews M, Wehrli P, Seignani C, Yu D, Ricci S, el-Deiry W, Aronow B, Kaya G, Saurat JH, French LE (2004). **Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo.** *Cancer Res.* 64(9):3126-36.

Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Qian XH, Zhao XH (2003). **Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches.** *World J Gastroenterol.* 9(4):650-4.

Redondo M, Villar E, Torres-Muñoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK (2000). **Overexpression of clusterin in human breast carcinoma.** *Am J Pathol.* 157(2):393-9.

Chayka O, Corvetta D, Dews M, Caccamo AE, Piotrowska I, Santilli G, Gibson S, Sebire NJ, Himoudi N, Hogarty MD, Anderson J, Bettuzzi S, Thomas-Tikhonenko A, Sala A (2009). **Clusterin, a haploinsufficient tumor suppressor gene in neuroblastomas.** *J Natl Cancer Inst.* 101(9):663-677.

Chen T, Turner J, McCarthy S, Scaltriti M, Bettuzzi S, Yeatman TJ (2004). **Clusterin-mediated apoptosis is regulated by Adenomatous Polyposis Coli and is p21 Dependent but p53 independent.** *Cancer Res.* 64(20):7412-9.

Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG (2004). **Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis.** *Oncogene.* 23(13):2298-304.

Bettuzzi S, Davalli P, AstanColle S, Carani C, Madeo B, Tampieri A, Corti A (2000). **Tumour 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(1):28-34.

Bettuzzi S, Scaltriti M, Caporali A, Brausi M, D'Arca D, AstanColle S, Davalli P, Corti A (2003). **Successful prediction of prostate cancer recurrence by gene profiling in combination with clinical data: a 5-year follow-up study.** *Cancer Res.* (13):3469-72.

Rizzi F, Belloni L, Crafa P, Lazzaretti M, Remondini D, Ferretti S, Cortellini P, Corti A, Bettuzzi S (2008). **A novel gene signature for molecular diagnosis of human prostate cancer by RT-qPCR.** *PLoS One.* 3(10):e3617.

Scaltriti M, Brausi M, Amorosi A, Caporali A, D'Arca D, AstanColle S, Corti A, Bettuzzi S (2004c). **Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer.** *Int J Cancer.* 108(1):23-30.

July LV, Akbari M, Zellweger T, Jones EC, Goldenberg SL, Gleave ME (2002). **Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy.** *Prostate.* 50(3):179-88.

Bettuzzi S, Davalli P, Davoli S, Chayka O, Rizzi F, Belloni L, Pellacani D, Fregni G, AstanColle S, Fassan M, Corti A, Baffa R, Sala A (2009). **Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumourigenesis and metastatic spread.** *Oncogene.* 28(49):4344-52.

Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM

(1995). **Prostate cancer in a transgenic mouse.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(8):3439-4

Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM (1999). **Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model.** *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2(2):70-75.

Kaplan-Lefko PJ, Chen TM, Ittmann MM, Barrios RJ, Ayala GE, Huss WJ, Maddison LA, Foster BA, Greenberg NM (2003). **Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model.** *Prostate.* 55(3):219-37.

McLaughlin L, Zhu G, Mistry M, Ley-Ebert C, Stuart WD, Florio CJ, Groen PA, Witt SA, Kimball TR, Witte DP, Harmony JA, Aronow BJ (2000). **Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis.** *J Clin Invest.* 106(9):1105-13.

Shukla S, Maclennan GT, Marengo SR, Resnick MI, Gupta S (2005). **Constitutive activation of P I3 K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model.** *Prostate.* 264(3):224-39.

Wu ZH, Miyamoto S (2008). **Induction of a pro-apoptotic ATM-NF-kappaB pathway and its repression by ATR in response to replication stress.** *EMBO J.* 27(14):1963-73.

Chiaverotti T, Couto SS, Donjacour A, Mao JH, Nagase H, Cardiff RD, Cunha GR, Balmain A (2008). **Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer.** *Am J Pathol.* 172(1):236-46.

Markopoulou S, Kontargiris E, Batsi C, Tzavaras T, Trougakovs I, Boothman DA, Gonos ES, Kolettas E (2009). **Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin.** *FEBS J.* 276(14):3784-99

Lutz W, Leon J, Eilers M (2002). **Contributions of Myc to tumorigenesis.** *Biochim Biophys Acta.* 1602(1):61-71.

Vita M, Henriksson M (2006). **The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer.** *Semin Cancer Biol.* 16(4):318-30.

Yaylim-Eraltan I, Bozkurt N, Ergen A, Zeybek U, Ozturk O, Arikan S, Erbil Y, Uslu I, Camlica H, Isbir T (2008). **L-myc gene polymorphism and risk of thyroid cancer.** *Exp Oncol.* 30(2):117-20.

Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Sevignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A (2006). **Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster.** *Nat Genet.* 38(9):1060-5.

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendel JT (2005). **c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression.** *Nature* 435:839-843.

Lipsick JS, Manak J, Mitiku N, Chen CK, Fogarty P, Guthrie E (2001). **Functional evolution of the Myb oncogene family.** *Blood Cells Mol Dis.* 27(2):456-8.

Oh IH, Reddy EP (1999). **The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis.** *Oncogene* 18:3017-3033

Sala A, Watson R (1999). **B-Myb protein in cellular proliferation, transcription control, and cancer: latest developments.** *J Cell Physiol.* 179(3):245-50.

Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Ariei S, Inazawa J, Okanoue T (2008). **Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma.** *Hepatol Res.* (9):886-95.

Raschellà G, Cesi V, Amendola R, Negroni A, Tanno B, Altavista P, Tonini GP, De Bernardi B, Calabretta B (1999). **Expression of B-myb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification.** *Cancer Res.* 59(14):3365-8.

Santilli G, Schwab R, Watson R, Ebert C, Aronow BJ, Sala A (2005). **Temperature-dependent modification and activation of B-MYB: implications for cell survival.** *J Biol Chem.* 280(16):15628-34

Orlandi A, Pucci S, Ciucci A, Pichiorri F, Ferlosio A, Spagnoli LG (2005). **Modulation of clusterin isoforms is associated with all-trans retinoic acid-induced proliferative arrest and apoptosis of intimal smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(2):348-53.

Gilmore TD (2006). **Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives.** *Oncogene.* 25(51):6680-4.

Perkins ND (2007). **Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):49-62.

Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB (2002). **IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamm are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program.** *J Biol Chem.* 277(47):45129-40

Saura J, Petegnief V, Wu X, Liang Y, Paul SM (2003). **Microglial apolipoprotein E and astroglial apolipoprotein J expression in vitro: opposite effects of lipopolysaccharide.** *J Neurochem.* 85(6):1455-67.

Devauchelle V, Essabani A, De Pinieux G, Germain S, Tourneur L, Mistou S, Margottin-Goguet F, Anract P, Migaud H, Le Nen D, Lequerré T, Saraux A, Dougados M, Breban M, Fournier C, Chiocchia G (2006). **Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis.** *J Immunol.* 177(9):6471-9.

Savković V, Gantzer H, Reiser U, Selig L, Gaiser S, Sack U, Klöppel G, Mössner J, Keim V, Horn F, Bödeker H (2007). **Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties.** *Biochem Biophys Res Commun.* 356(2):431-7.

Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Fujita T, Quigg RJ, Hayashi M (2008a). **NF-kappaB-dependent genes induced by proteinuria and identified using DNA microarrays.** *Clin Exp Nephrol.* 12(3):181-8.

Takase O, Minto AW, Puri TS, Cunningham PN, Jacob A, Hayashi M, Quigg RJ (2008b). **Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis.** *Kidney Int.* 73(5):567-77.

Criswell T, Beman M, Araki S, Leskov K, Cataldo E, Mayo LD, Boothman DA (2005). **Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor.** *J Biol Chem.* 280(14):14212-21.

Patterson SG, Wei S, Chen X, Sallman DA, Gilvary DL, Zhong B, Pow-Sang J, Yeatman T, Djeu JY (2006). **Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells.** *Oncogene.* 25(45):6113-22.

Reik W, Walter J (2001). **Genomic imprinting: parental influence on the genome.** *Nat Rev Genet.* 2(1):21-32. Review.

Reik W, Dean W, Walter J (2001). **Epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Science.* 293(5532):1089-93.

Avner P, Heard E (2001). **X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation.** *Nat Rev Genet.* 2(1):59-67.

Herman JG, Baylin SB (2003). **Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.** *N Engl J Med.* 349(21):2042-54.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001). **A gene hypermethylation profile of human cancer.** *Cancer Res.* 61(8):3225-9.

Esteller M (2003). **Relevance of DNA methylation in the management of cancer.** *Lancet Oncol.* 4(6):351-8.

Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB (1999). **Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.** *Nat Genet.* 21(1):103-7.

Yoo CB, Jones PA (2006). **Epigenetic therapy of cancer: past, present and future.** *Nat Rev Drug Discov.* (1):37-50.

Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB (2002). **A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer.** *Nat Genet.* 31(2):141-9.

Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, Sato F, Meltzer SJ, Sidransky D (2002). **Pharmacologic**

unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell.* 2(6):485-95.

Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, Hermeking H (2005). **Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer.** *Cancer Res.* 65(10):4218-27.

Rauhala HE, Porkka KP, Saramäki OR, Tammela TL, Visakorpi T (2008). **Clusterin is epigenetically regulated in prostate cancer.** *Int J Cancer.* 123(7):1601-9.

Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammam D, Chen X, Kuban RJ, Ungethüm U, Krapfenbauer U, Herzel HP, Schäfer R, Walter J, Sers C (2006). **Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation.** *Oncogene.* 25(35):4890-903.

Hellebrekers DM, Melotte V, Viré E, Langenkamp E, Molema G, Fuks F, Herman JG, Van Criekinge W, Griffioen AW, van Engeland M (2007). **Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells.** *Cancer Res.* 67(9):4138-48.

Suuronen T, Nuutinen T, Ryhänen T, Kaarniranta K, Salminen A (2007). **Epigenetic regulation of clusterin/apolipoprotein J expression in retinal pigment epithelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 357(2):397-401.

Nuutinen T, Suuronen T, Kyrylenko S, Huuskonen J, Salminen A (2005). **Induction of clusterin/apoJ expression by histone deacetylase inhibitors in neural cells.** *Neurochem Int.* 47(8):528-38.

Hayflick L, Moorhead PS (1961). **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Exp. Cell Res.* 25: 585-621.

Hayflick L (1965). **The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.** *Exp. Cell Res.* 37: 614-636.

Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL, Gardner MB (1977). **Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs 578T) and the diploid myoepithelial (Hs 578Bst) cell lines.** *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1795-1806.

Reddel *et al.* (1989). **Immortalized human bronchial epithelial mesothelial cell lines.** *US Patent 4,885,238*

Cussenot O, Berthon P, Berger R, Mowszowicz I, Faille A, Hojman F, Teillac P, Le Duc A, Calvo F (1991). **Immortalization of human adult normal prostatic epithelial cells by liposomes containing large T-SV40 gene.** *J Urol.* 146(3): 881-886.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973). **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1417-1423.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.** *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1416.

Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL (1994). **Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue.** *Cancer Res.* 54: 2615-2621.

Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM (1985). **Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.** *Science* 230: 943-945.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979). **Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).** *Invest. Urol.* 17(1): 16-23.

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978). **Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).** *Int. J. Cancer* 21: 274-281.

Papsidero LD, Kuriyama M, Wang MC, Horoszewicz J, Leong SS, Valenzuela L, Murphy GP, Chu TM (1981). **Prostate antigen: a marker for human prostate epithelial cells.** *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 37-42.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005). **MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.** *Bioinformatics.* 21(13): 2933-42.

Brooks AR, Nagy BP, Taylor S, Simonet WS, Taylor JM, Levy-Wilson B, (1994). **Sequences containing the second-intron enhancer are essential for transcription of the human apolipoprotein B**

gene in the livers of transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 14(4): 2243-56.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996). **Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18):9821-6.

Li LC, Dahiya R (2002). **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.** *Bioinformatics.* 18(11): 1427-31.

Patra SK, Patra A, Rizzi F, Ghosh TC, Bettuzzi S (2008). **Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development.** *Cancer Metastasis Rev.* 27(2):315-34.

Patra SK, Bettuzzi S (2009). **Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation.** *Biochemistry (Mosc).* 74(6):613-9.

Tamaru H, Selker EU (2001). **A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*.** *Nature.* 414(6861):277-83.

Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B (2003). **Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene.** *Cancer Cell.* 3(1):89-95.

Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003). **Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin.** *Curr Biol.* 13(14):1192-200.

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T (2000). **DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity.** *Nat Genet.* 24(1):88-91.

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000). **DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.** *Nat Genet.* 25(3):338-42.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB (2000). **DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.** *Nat Genet.* 25(3):269-77.