



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare
Ciclo XXI

APOJ/CLUSTERINA: UN NUOVO SOPPRESSORE TUMORALE PER IL NEUROBLASTOMA

Coordinatore :

Chiar.mo Prof. Giancarlo Gazzola

Tutor:

Chiar.mo Prof. Saverio Bettuzzi

DOTTORANDO: Daisy Corvetta

*A Daniele, a Federico
e ai miei genitori*

INDICE

1.	
Sommario	pag 6
2. Introduzione	pag 8
2 Il neuroblastoma:.....	pag 8
1. Stadiazione del tumore.....	pag 13
2. Terapia.....	pag 17
3. Alterazioni genetiche e molecolari:l'oncoproteina MYCN.....	pag 18
4. MYCN e il suo ruolo nello sviluppo del neuroblastoma e di altre patologie neoplastiche.....	pag 20
5. MYCN e il controllo della struttura della cromatina.....	pag 23
2.2 La Clusterina:.....	pag 26
1.Struttura della clusterina.....	pag 26
2. Sintesi e degradazione.....	pag 28
3. Il ruolo biologico della clusterina e il suo coinvolgimento nell'attivazione e/o soppressione tumorale.....	pag 31
2.3 Il ruolo della clusterina nel neuroblastoma.....	pag 37
3. Materiali e metodi	pag 39
3.1 Colture cellulari.....	pag 39
3.2 Saggio colorimetrico.....	pag 40

3.3 Trattamento con farmaci epigenetici.....	pag 41
3.4 Western blotting.....	pag 42
3.5 Vettori d'espressione.....	pag 44
3.6 Mutagenesi sito-diretta con oligonucleotidi e PCR.....	pag 45
3.7 Saggio d'attivit� luciferasica.....	pag 46
3.8 Trasfezione stabile e transiente.....	pag 47
3.9 Saggio di Immunoprecipitazione della cromatina (ChiP).....	pag 48
3.10 Analisi del ciclo cellulare mediante l'impiego del citofluorimetro (Analisi al FACS).....	pag 49
3.11 Saggio di Invasivit� Cellulare.....	pag 51

4. Risultati.....pag 53

4.1 Livello d'espressione di clusterina in tumori umani e neuroblastoma.....	pag 53
4.2 Calo del livello d'espressione di clusterina in presenza di MYCN.....	pag 56
4.3 La riduzione nei livelli d'espressione della clusterina e' causata da un'interazione diretta di MYCN con il promotore della clusterina:.....	pag 59
1. MYCN e' in grado di legare direttamente il promotore della clusterina.....	pag 60
2. Interazione <i>in vitro</i> ed interazione <i>in vivo</i> di MYCN con la clusterina.....	pag 62

3. MYCN e' in grado di regolare negativamente l'espressione della clusterina attraverso l' interazione diretta con la E-BOX presente sul promotore della clusterina.....	pag 65
4.4 La clusterina e' soggetta ad alterazioni epigenetiche che ne inibiscono l'espressione.....	pag 67
4.5 Trattamenti con farmaci demetilanti e/o acetilanti in grado di riportare il livello d'espressione della clusterina a livelli normali.....	pag 69
1. Correlazione con effetti sul ciclo cellulare ed apoptosi in cellule di neuroblastoma.....	pag 72
4.6 L'efficacia dei farmaci deacetilanti (HDAC INHIBITORS) e' dipendente dalla riattivazione della clusterina.....	pag 74
5. Discussione.....	pag 80
6. Bibliografia.....	pag 83
7. Ringraziamenti.....	pag 104

SOMMARIO

La clusterina e' una proteina ubiquitaria il cui ruolo biologico e' attualmente motivo di studio e discussione.

Studi condotti da diversi gruppi di ricerca ne hanno evidenziato sia la overespressione che il silenziamento in differenti tumori umani. Definire un ruolo fisiologico per questa proteina risulta ulteriormente difficile in seguito a studi che la descrivono come promotore dell'apoptosi, della motilita' cellulare e dell' infiammazione. Il gene della clusterina codifica per diverse isoforme proteiche, quella citoplasmatica e quella nucleare, derivanti da uno stesso mRNA, in seguito a modificazioni post-traduzionali. Queste diverse isoforme sono implicate sia nel processo di sopravvivenza cellulare, sia in quello di morte cellulare.

E' possibile che la scelta tra sopravvivenza cellulare e apoptosi sia strettamente correlata con la differente espressione di queste due isoforme, quella citoplasmatica e quella nucleare. Nel cancro, l'alterazione nel pattern d'espressione della clusterina e' stato visto nella prostata, seno, pancreas, vescica ed esofago. Nel neuroblastoma, studi precedentemente condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato come la clusterina sia in grado di regolare negativamente l'oncoproteina NF-kB. Inoltre la delezione genetica di clusterina determina un'incremento dell'incidenza di neuroblastomi in modello murino.

Recentemente e' stato dimostrato che la clusterina, nel neuroblastoma, e' negativamente e indirettamente regolata dal protooncogene MYCN attraverso

l'attivazione del cluster miRNAs 17-92. MYCN e' un fattore trascrizionale in grado di regolare direttamente o indirettamente l'espressione genetica dei suoi geni bersaglio. L'interazione indiretta avviene mediante il reclutamento di altre molecole quali HDAC o DNA metiltransferasi che , agendo a livello della struttura della cromatina, modulano l'espressione del gene bersaglio. MYCN agisce direttamente legandosi a specifiche sequenze consenso (E-BOX) presenti sul promotore del gene target. Il promotore della clusterina presenta diverse sequenze consenso target-specifiche per MYCN.

L'alterazione delle strutture che riducono o aumentano l'accessibilità alla trascrizione e traduzione dei geni, si configura come un evento epigenetico che determina un'alterazione dell' equilibrio cellulare favorendo lo sviluppo di cellule tumorali.

L'utilizzo di farmaci demetilanti e/o inibitori dell'istone deacetilasi sono in grado di riportare il livello d'espressione di ApoJ/clusterina a livelli normali in diversi tipi di linee cellulari, comprese quelle di neuroblastoma.

INTRODUZIONE

1. IL NEUROBLASTOMA

Il neuroblastoma è un tumore maligno embrionale, specifico del bambino, che origina dal tessuto nervoso simpatico e colpisce più facilmente la ghiandola surrenale e i gangli paraspinali (1,2). Fra i tumori solidi dell'infanzia è, dopo quelli che interessano il SNC (sistema nervoso centrale), il più diffuso (8%), con un'incidenza pari a 10 casi per milione ogni anno (3,4).

La localizzazione cambia a seconda dell'età del soggetto: Nei bambini di età inferiore ad un anno ad esempio è molto diffuso nel torace (33%), in quelli più grandi la sede di maggiore diffusione è l'addome (55-75%) (3,4).

Nonostante il neuroblastoma rappresenti il tumore solido extra cranico più frequente in soggetti d'età inferiore ai 5 anni, è uno dei tumori più misteriosi, caratterizzato da una grande eterogeneità sia del quadro clinico, che della prognosi che va dalla relativa benignità dello stadio 4S, all'estrema gravità dello stadio 4, la forma più aggressiva, con probabilità di sopravvivenza bassa e letalità del 40% nonostante l'utilizzo di terapie (2, 5, 6).

I sintomi del neuroblastoma sono variabili e dipendono in parte dalla sede del tumore primitivo, ma anche dalla presenza o meno di metastasi o di sindromi paraneoplastiche

(7). Sebbene vi possano essere delle sovrapposizioni, tre sono i possibili quadri di presentazione (insorgenza) caratteristici della malattia (6) (Fig.1):

1.

Tumori localizzati: Circa il 40% dei pazienti si presenta con una forma di malattia localizzata, che può andare dalla scoperta casuale di una massa surrenalica evidenziata nel corso di un' ecografia prenatale, all'identificazione di tumori molto estesi e localmente invasivi, lungo la catena del sistema nervoso simpatico in pazienti di età maggiore. Anche questi tumori primitivi a localizzazione toracica possono essere identificati in maniera accidentale nel corso di un esame radiologico del torace, a differenza delle masse a livello cervicale che spesso si associano alla sindrome di Horner (ptosi della palpebra superiore + miosi + restringimento della fessura palpebrale) (8).

I tumori paraspinali del torace, dell'addome e della pelvi si ritrovano nel 5-15% dei pazienti: si possono estendere ai forami neurali intervertebrali (neuroblastomi a clessidra), determinando sintomi da compressione delle radici nervose e del midollo spinale. Circa il 5% di tutti i neuroblastomi sono diagnosticati in pazienti che presentano segni neurologici di interessamento del midollo, con stanchezza, dolore e perdita della sensibilità. Questi tumori localizzati in generale rispondono al trattamento chemioterapico e/o alla laminectomia (asportazione chirurgica parziale o totale della/e lamina/e di una o più vertebre, ottenendo in tal modo un'apertura del canale vertebrale che consente l'approccio diretto per il trattamento di patologie spinali degenerative, traumatiche, malformative o neoplastiche). La laminectomia può però avere delle

conseguenze a lungo termine, quindi la maggior parte dei ricercatori raccomanda la chemioterapia come trattamento di scelta per i neuroblastomi paraspinali sintomatici.

In questi pazienti si osservano due importanti sindromi paraneoplastiche: la diarrea acquosa intrattabile, che cessa con l'asportazione del tumore, e la sindrome opsoclonomioclonia, osservata nel 2-4% dei pazienti con neuroblastoma: essa consiste in movimenti rapidi degli occhi, atassia e movimenti muscolari irregolari. In questi casi la prognosi è favorevole, anche se il 70-80% di questi bambini presentano successivamente deficit neurologici permanenti (9).

2.

Malattia metastatica: Circa la metà dei pazienti si presenta con metastasi ematogene. Le metastasi possono essere a distanza, quindi localizzate in aree come la parte corticale delle ossa, midollo, fegato e nei linfonodi regionali non contigui, o per diffusione del tumore primitivo nei linfonodi adiacenti.

A differenza di quanto si osserva nei bambini con tumori localizzati, le condizioni generali dei bambini con tumori metastatizzati sono povere al momento della diagnosi. Peraltro questi tumori hanno una tendenza, la cui ragione è a tutt'oggi inspiegata, a metastatizzare nelle ossa dell'orbita e quindi indurre ecchimosi delle orbite e proptosi (protrusione o avanzamento anomalo dell'occhio). Talvolta questi pazienti possono presentare sintomi ipertensivi, renina-mediati, dovuta alla compromissione della vascolarizzazione renale. Con l'evolvere della malattia, si può osservare la diffusione del tumore nel sistema nervoso centrale (10).

3.

Malattia 4S: Nel 1971 D'Angio e collaboratori descrissero per primi questa forma di neuroblastoma che si osserva nel 5% dei pazienti (11). Questi bambini hanno un piccolo tumore primitivo con metastasi al fegato, alla cute e al midollo osseo, che regrediscono quasi sempre spontaneamente. Tuttavia i bambini in età inferiore ai 2 mesi possono presentare una diffusione epatica estesa e rapidamente progressiva, che può addirittura arrivare a compromettere la respirazione.

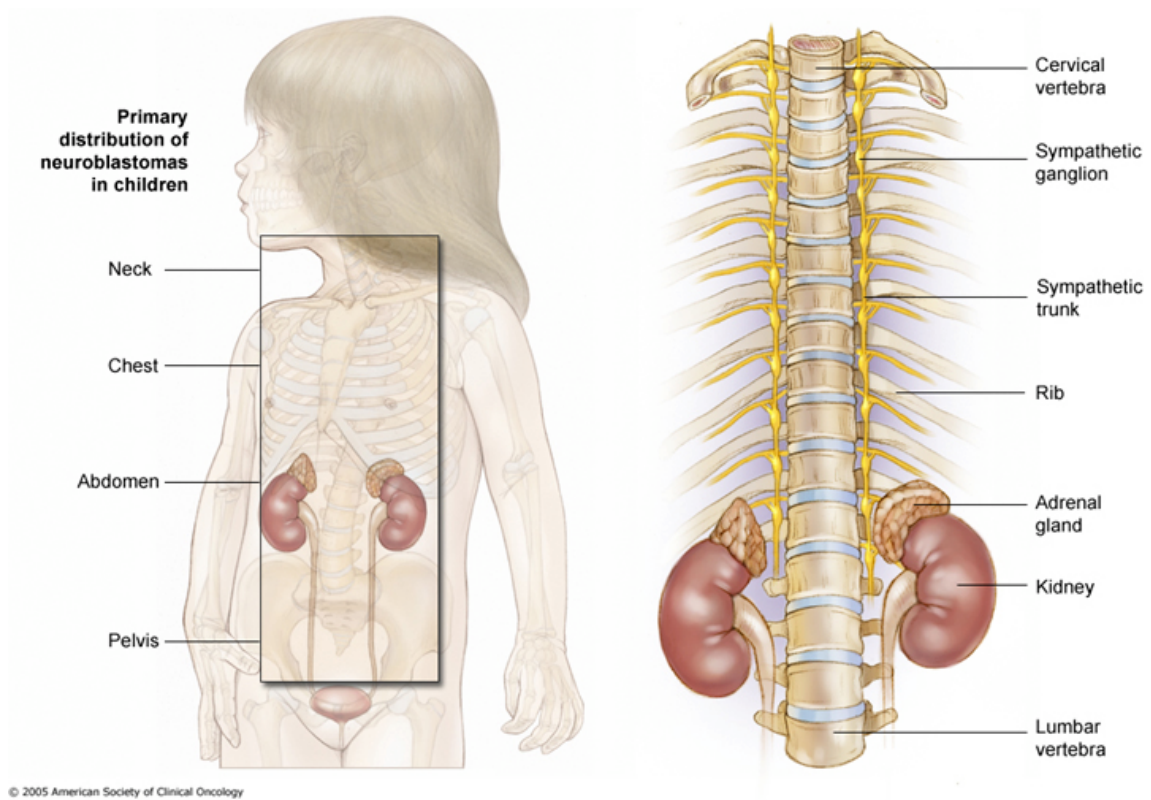


Fig 1. American Society of Clinical Oncology 2005

Stadiazione del tumore

L'International Neuroblastoma Staging System ha sviluppato i criteri di stadiazione che vengono utilizzati in tutto il mondo (Tabella 1). Questi studi hanno dimostrato che le caratteristiche radiologiche del tumore primario sono utili per predire quale possa essere il trattamento chirurgico migliore con la più alta probabilità di successo. Gli aspetti (loco) radiologici sono stati usati per distinguere i tumori locoregionali che non interessano strutture adiacenti (INRG stadio L1) dai tumori localmente invasivi (INRG stadio L2). Gli stadi M ed MS sono stati proposti per categorizzare tumori che siano ampiamente metastatici o che abbiano un comportamento 4S (Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, and Ganglioneuroma: Radiologic-pathologic Correlation, Gael F., Lonergan Lt Col., USAF, MC• Cornelia M. Schwab, MD Eric S. Suarez, CDR, MC, USN• Christian L. Carlson, 2LT, MC, USA; *AFIP Archives*).

Stadio	Caratteristiche del tumore
1	Tumore localizzato con completa escissione grossolana, con o senza malattia microscopica residua, rappresentata da linfonodi ipsolaterali negativi microscopicamente per tumore (i linfonodi aderenti al tumore e rimossi con il tumore primitivo possono essere positivi).
2A	Tumore localizzato con escissione grossolana incompleta, con linfonodi ipsolaterali non aderenti, positivi per tumore.
2B	Tumore localizzato con o senza escissione completa grossolana, con linfonodi ipsolaterali non aderenti positivi per tumore. I linfonodi controlaterali ingranditi debbono essere negativi microscopicamente.
3	Tumore unilaterale non resecabile con o senza ininteressamento dei linfonodi regionali o tumore localizzato unilaterale con interessamento dei linfonodi regionali contro laterali o tumore della linea mediana con estensione bilaterale dell'infiltrazione (non resecabile) o con interessamento dei linfonodi
4	Ogni tumore primario con disseminazione a linfonodi distanti, all'osso, al midollo osseo o ad altri organi (eccetto lo stadio 4S)
4S	Tumore primario localizzato in lattanti più giovani di un anno (come definiti dagli stadi 1, 2A e 2B), con disseminazione limitata alla pelle, al fegato o al midollo osseo (< 10% di cellule maligne)

Tabella 1. Stadiazione INSS

Nel 1984 Shimada (12) ha presentato uno schema classificativo che mette in relazione gli aspetti isto-patologici del tumore con il comportamento clinico. I tumori sono stati classificati come favorevoli e non favorevoli a seconda del grado di differenziazione neuroblastica, il contenuto di stroma Schwanniano, l'indice di mitosi e l'età alla diagnosi. (Tabella 2).

Classificazione internazionale del neuroblastoma	Eta'(in anni)	Istologia	Prognosi
Neuroblastoma (povero in stroma)	<1.5	Poco differenziato o differenziato e MKI basso o intermedio	Favorevole
	1,5-5	Differenziato con MKI basso	Favorevole
	<1,5	Tumore indifferenziato MKI basso	Sfavorevole
	1,5-5	Tumore indifferenziato o poco differenziato, qualunque MKI	Sfavorevole
	>5	Tutti i tumori	Sfavorevole
Ganglioneuroblastoma intermedio (ricco in stroma)	A tutte le eta'	Tutti i tumori	Favorevole
Ganglioneuroma in maturazione e maturo (stroma dominante)	A tutte le eta'	Tutti i tumori	Favorevole
Ganglioneuroblastoma Nodulare (sia stroma ricco, sia povero che dominante)	A tutte le eta'	Tutti i tumori	Favorevole

Tabella 2. International Neuroblastoma Staging System

Terapia

Attualmente il trattamento è basato sulla chemioterapia, che riduce le dimensioni del tumore primitivo (facilitando la chirurgia) ed eradica le metastasi a distanza. L'intervento chirurgico è raccomandato in tutti i casi in cui la localizzazione del tumore lo consente; la radioterapia locale è utile nel completare la terapia. Le possibilità di sopravvivenza senza recidiva sono comprese tra il 50 e il 70% in generale, ma solo il 30% nei tumori metastatici.

Alterazioni genetiche e molecolari: L'oncoproteina MYCN

All'interno del quadro delle alterazioni genetiche e molecolari e' di rilievo l'amplificazione del protooncogene MYCN, un gene a risposta precoce originariamente isolato da cellule di neuroblastoma (13, 14). Il gene MYCN mappa sul braccio corto del cromosoma 2. L'amplificazione di MYCN si riscontra in circa il 30% dei neuroblastomi ed e' associata con lo stadio piu' avanzato della malattia (15, 16).

A conferma di quanto appena detto, da dati ottenuti da pazienti con ganglioneuroblastoma nodulare e' emerso che l'amplificazione di MYCN in tumori non metastatici e' associata con una prognosi sfavorevole del tumore (17, 18).

Anche la delezione del braccio corto del cromosoma 1 (1p), riscontrabile nel 25-35% dei casi, e' correlata sia con l'amplificazione di MYCN che con lo stadio avanzato della malattia (19). L'oncoproteina MYCN appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali b/HLH/zip (cerniera a leucina e un motivo HLH) implicati nella regolazione della crescita e proliferazione cellulare. Il fattore trascrizionale MYCN e' costituito da un dominio N-terminale per l'attivazione trascrizionale e da un dominio C-terminale b/HLH/zip per la dimerizzazione delle proteine, legame sequenza specifico al DNA e regolazione della trascrizione (20). MYCN forma un eterodimero con un membro della stessa famiglia di proteine, Max, che in condizioni fisiologiche, interagisce con le sequenze E-BOX di vari promotori target per MYCN (21). L'associazione tra Max e

MYCN e' necessaria perche' si produca la trasformazione maligna mediata dall'oncogene MYCN (22) (Fig.2).

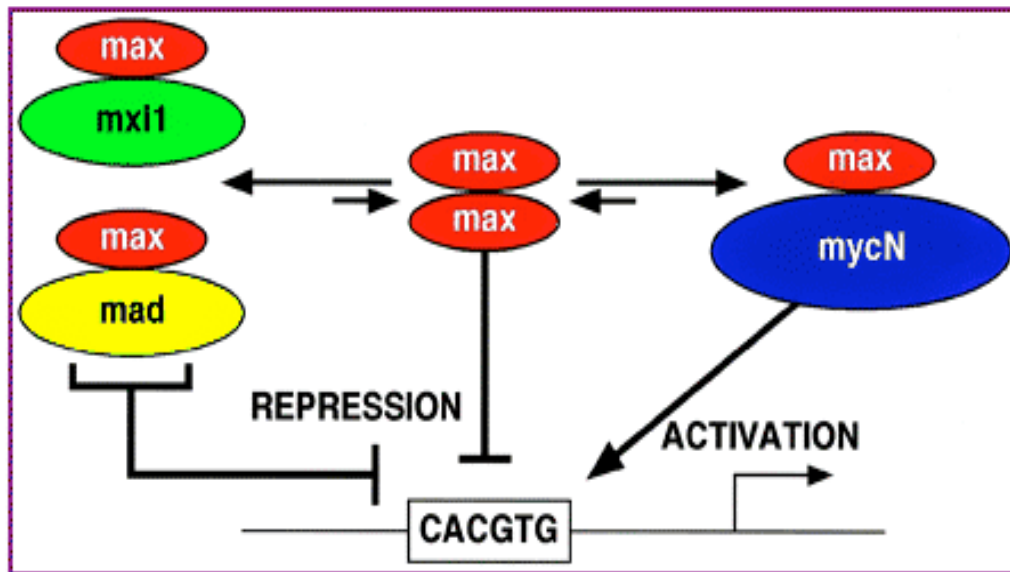


Fig 2: Meccanismo d'azione del complesso eterodimerico MYCN/MAX

Diversamente dall'oncogene MYC, il quale è espresso in maniera ubiquitaria, MYCN ha una espressione molto ristretta dopo la nascita nelle cellule di mammifero, confinata al sistema nervoso centrale e periferico, reni, polmoni e milza (23).

MYCN e il suo ruolo nello sviluppo del neuroblastoma e di altre patologie neoplastiche

L'espressione dell'oncogene MYCN in un modello transgenico murino causa lo sviluppo di neuroblastoma con caratteristiche sovrapponibili al neuroblastoma umano, dimostrando il ruolo chiave di MYCN nell'insorgenza e sviluppo di questo tumore (24, 25). Nello stesso modello animale, la riduzione dell'espressione di MYCN mediante l'impiego di oligonucleotidi antisenso, causa una riduzione della proliferazione ed induce la differenziazione neuronale delle cellule di neuroblastoma (26). Esperimenti condotti in cellule di neuroblastoma umano hanno evidenziato che, la riduzione dei livelli di MYCN provoca una riduzione del tempo necessario per procedere attraverso le varie fasi del ciclo cellulare, riduzione della proliferazione e dell'adesione alla matrice extracellulare (27).

La proteina p53 svolge un ruolo fondamentale nel controllo della crescita cellulare umana e, mutazioni a carico di questa, sono spesso associate con la formazione di tumori. Inoltre, p53 ricopre un ruolo determinante nel mantenimento dell'integrità genomica, durante la divisione cellulare mediante interazioni molecolari con MDM2, BAX e la proteina p21^{WAF1}, un'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti che, quando viene attivato da p53, determina l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 (28). Durante questa fase di arresto del ciclo cellulare, nella cellula si attivano meccanismi in grado sia di riparare l'eventuale DNA danneggiato, oppure dare inizio al processo della morte cellulare programmata (apoptosi) (29).

La proteina p53, nella sua forma wild type, e' in grado di legare sequenze specifiche dei geni codificanti proteine che regolano l'apoptosi, attivandoli.

Negli ultimi 20 anni sono state identificate, in una varieta' di cellule tumorali, diverse mutazioni nella sequenza del gene codificante per p53. Le proteine, codificate dal gene mutato, hanno in comune la caratteristica di aver perso la capacita' di legare le sequenze specifiche nel DNA dei geni normalmente controllati da p53 e, di conseguenza, non possono attivarne la trascrizione e l'attivazione (30).

In studi effettuati sull'espressione di p53 nel neuroblastoma e' emerso che raramente questa proteina risulta mutata (31,32). MDM2, un oncogene che interagisce con p53 inducendone la degradazione, e' un gene target per MYCN che si lega alla E-BOX presente nella regione P2 del promotore di MDM2. Questa interazione comporta un incremento nell'espressione di MDM2 con consecutiva diminuzione nell'espressione di p53 ed inibizione dell'apoptosi (33).

Da diversi studi e' emerso che MYCN e' in grado di reprimere l'espressione genica, senza interagire direttamente con le sequenze E-BOX presenti sui promotori dei suoi geni bersaglio ma, formando un complesso con la proteina Miz-1, appartenente alla famiglia dei fattori trascrizionali POZ/domain zinc finger (dominio POZ/dita di zinco). Il complesso MYCN/Miz1 si lega al promotore di geni bersaglio e con l'aiuto di Dnmt3a (DNA-metiltransferasi in grado di aggiungere gruppi metilici al DNA senza modificarlo) ne determina il silenziamento (34, 35).

MYCN puo' quindi essere considerato un fattore trascrizionale in grado sia di attivare che reprimere l'espressione di molti geni bersaglio. Negli ultimi anni la ricerca ha

focalizzato la sua attenzione sullo studio dei microRNAs (miRNAs), piccole molecole di RNA a singolo filamento di 20-22 nucleotidi ,che sono coinvolte nella regolazione di diversi processi fisiologici quali ad esempio, apoptosi, proliferazione e differenziamento (36). Gli miRNAs agiscono a livello post-trascrizionale degradando l'mRNA e reprimendone la traduzione mediante interazione diretta sequenza-specifica con la 3'UTR dell'mRNA bersaglio (37). MYCN sembra svolgere un ruolo nella regolazione dell'espressione degli miRNAs (36). Berwanger e collaboratori, da un'analisi di microarray, eseguita su 384 differenti miRNA, ha identificato 7 miRNA indotti da MYCN *in vitro* e overespressi in neuroblastoma primari con MYCN amplificato. Tre dei sette miRNAs appartengono ai cluster miR-106a e miR-17 i quali sono a loro volta regolati da c-MYC. Il policistrone miR-17-92 agisce come oncogene nelle cellule progenitrici emapoietiche (38). Gli stessi autori hanno idendificato un'altro miRNA indotto da MYCN: l'miR-221. Queste considerazioni hanno contribuito all'ipotesi che MYCN reprima l'espressione di molti geni bersaglio mediante l'induzione di diversi miRNAs.

MYCN e il controllo della struttura della cromatina

Da studi eseguiti sulle cellule staminali pluripotenti (iPS) (39) sembra evidente che MYCN riveste un ruolo determinante anche nella regolazione di queste cellule. Il meccanismo d'azione non è stato ancora chiaro, ma sembrerebbe che MYCN sia coinvolto nel processo di regolazione degli istoni con consecutivo rimodellamento della cromatina (40, 41). L'espressione di un gene è regolata dallo stato della cromatina sia localmente (sul promotore) che nel dominio circostante. La struttura della cromatina può infatti essere modificata sia dall'attivazione specifica di un singolo gene bersaglio, ed in questo caso i cambiamenti della struttura e dell'organizzazione dei nucleosomi si verificano nelle immediate vicinanze del promotore; ma anche da cambiamenti più generali che influenzano una ampia regione genica, che può arrivare a coprire un intero cromosoma. Questi ultimi sono in grado di controllare il potenziale di un gene di essere espresso. Il meccanismo, alla base di entrambi i tipi di modifiche, è in realtà lo stesso: complessi proteici si legano alla cromatina e direttamente o indirettamente impediscono ai fattori di trascrizione e alla RNA polimerasi di attivare promotori presenti nella regione. I cambiamenti a livello di un singolo promotore controllano l'inizio della trascrizione di un gene particolare e possono essere attivatori o repressori (42).

La subunità fondamentale della cromatina è il nucleosoma. Esso è costituito da 146 paia di basi di DNA avvolte attorno all'ottamero istonico, che consiste di un tetramero $(H3)_2 - (H4)_2$ e di due dimeri H2A - H2B. A questo primo livello di compattamento

ne segue un secondo che richiede la presenza dell'istone H1. L'interazione con l'istone H1 fa sì che i nucleosomi si avvolgano ulteriormente ,formando una struttura a solenoide (fibra di 30nm) con 6 nucleosomi per giro. Il solenoide, a sua volta, si organizza topologicamente in anse ancorate ad uno scaffold proteico (fibra di 300 nm), ed infine la fibra si condensa ulteriormente fino a costituire il cromosoma metafisico (43). Tale grado di compattamento della cromatina ha un effetto repressivo sulla trascrizione. L'attivazione dell'espressione genica richiede il rimodellamento della cromatina ,che può avvenire sia attraverso modifiche delle code N-terminali degli istoni H3 e H4, quali acetilazione e ubiquitinazione delle lisine, metilazione delle lisine e arginine, fosforilazione delle serine, sia attraverso il reclutamento di complessi proteici, come ad esempio SWI-SNF, che rimodellano la cromatina idrolizzando ATP (44). Le modificazioni riducono la carica positiva e possono influenzare direttamente la struttura del nucleosoma o creare siti di legame per l'attacco di proteine non istoniche, che cambiano le proprietà della cromatina. L'acetilazione è catalizzata dalle HAT (istone acetiltransferasi) che, trasferendo il gruppo acetile dall'acetil coenzima A ai residui di lisina presenti nelle code N-terminali degli istoni, determinano il decompattamento della cromatina e quindi la formazione di una struttura trascrizionalmente permissiva. La deacetilazione è catalizzata dalle HDAC (istone deacetilasi) che, aumentando l'interazione DNA-istoni e istone-istone, inducono un maggiore compattamento della cromatina e quindi generano una struttura trascrizionalmente inattiva (45). Esiste una correlazione generale in cui l'acetilazione è associata alla cromatina attiva mentre la metilazione è associata alla cromatina inattiva,

ma questa non è una regola semplice e, oltre a combinazioni di specifiche modificazioni, possono essere importanti i particolari siti che sono modificati. Nelle cellule neuronali staminali la mancanza di MYCN è sufficiente a determinare il massimo livello di condensazione del DNA, suggerendo così un ruolo chiave di MYCN nell'attivazione dell'espressione genica. MYCN è in grado di interagire con diversi istoni acetiltransferasi quali GCN5 (46) e TIP60 (47) che acetilano diverse lisine dell'istone H3 e H4, ed è coinvolto nel meccanismo di rimodellamento della cromatina, mediante metilazione del residuo di lisina 4 dell'istone H3 (40).

Concludendo, l'oncogene MYCN è in grado di influenzare la regolazione dei diversi processi biologici quali: ciclo cellulare, metabolismo, differenziazione, senescenza e replicazione del DNA, mediante interazione diretta con il DNA bersaglio, il reclutamento di altri fattori trascrizionali o miRNAs, e in ultimo, influenzando il rimodellamento della cromatina.

2. LA CLUSTERINA

Struttura della clusterina

La clusterina è una glicoproteina di secrezione coinvolta in diversi processi fisiologici e patologici come la regressione tissutale o la neurodegenerazione nella malattia di Alzheimer (48). La clusterina è costitutivamente espressa in quasi tutti i tessuti di mammifero, ed è presente nei fluidi fisiologici come plasma, urina, latte e liquido seminale (49, 50, 51, 52).

L'induzione della clusterina è comune in molti stati fisiopatologici e di accrescimento cellulare, tanto da far supporre che il controllo del livello d'espressione sia molto importante.

La clusterina è stata isolata per la prima volta nella prostata di ratto sottoposto a castrazione nel 1986 da Montpetit (53) ma a tutt'oggi non è ancora stata definita in modo chiaro la sua funzione.

A questa proteina sono stati attribuiti molti nomi differenti, quali apolipoproteina J (appartenente alla famiglia delle HDL) (54), TRPM-2 (testosterone-repressed prostate message-2), SP 40-40 (secreted protein 40-40) (55), gp80 (glycoprotein 80), sulphate glycoprotein-2 (sulfated glycoprotein).

La forma secreta della clusterina è un eterodimero di 65-70 kDa.

Il gene codificante per la clusterina è stato isolato e sequenziato in diverse specie, tra cui l'uomo (56), il topo (57) ed il ratto (58). Il gene umano, presente in singola copia, si

estende su circa 16 Kb ed è composto da 9 esoni ed 8 introni. Il gene umano si trova sul cromosoma 8, regione p21 (48).

Sintesi e degradazione

La trascrizione del gene della clusterina dà origine generalmente ad un singolo mRNA di 2 Kb che viene consecutivamente tradotto dai ribosomi endoplasmatici in un polipeptide di 449 amminoacidi. Essendo una proteina di secrezione, possiede una sequenza leader di 22 amminoacidi necessaria per la sua traslocazione nel lume del reticolo endoplasmatico (59). Una volta incanalata nella via reticolo endoplasmatico-vescicole del Golgi, la clusterina va incontro a diverse modificazioni post-traduzionali che prevedono la formazione di ponti di-solfuro, glicosilazione e proteolisi. L'eterodimero risultante è costituito da 2 subunità: α e β . Le 2 catene sono disposte antiparallelamente una rispetto all'altra ed unite, a livello centrale, da 5 ponti disolfuro. La molecola matura è costituita da un cuore idrofobico fiancheggiato da 3 α -eliche anfipatiche e 2 α -eliche coiled-coil, e presenta 6 siti di possibile glicosilazione (Fig.3) (60, 61).

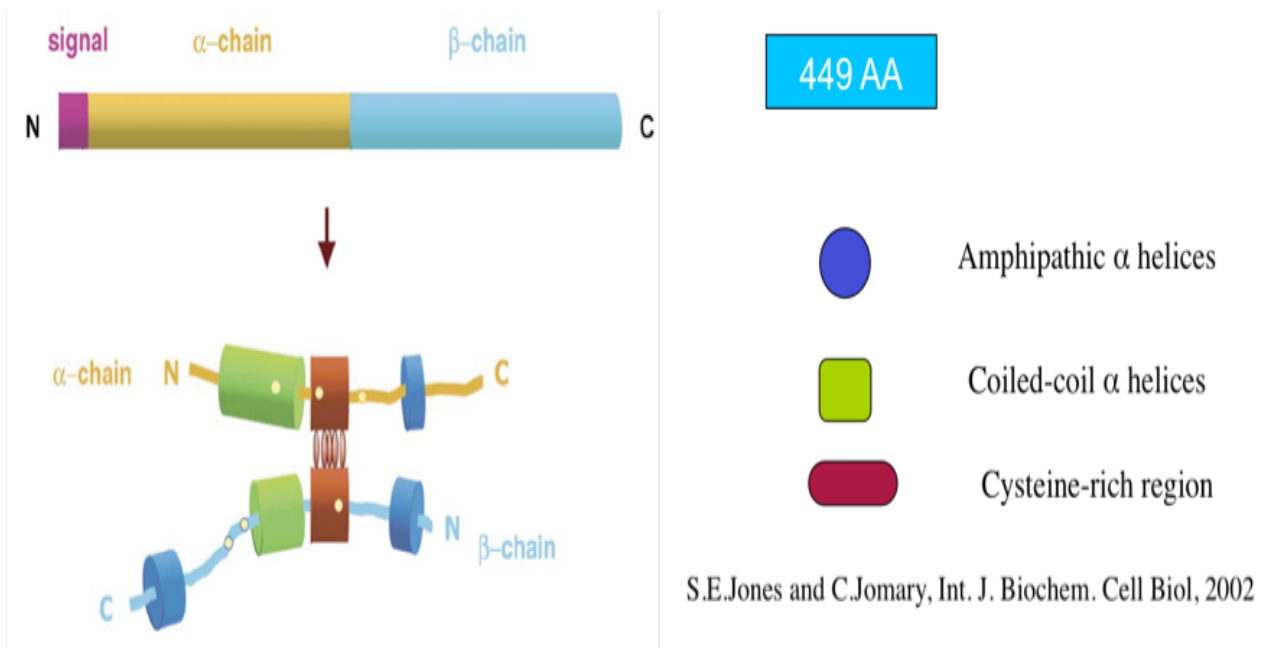


Fig 3. : Rappresentazione schematica della struttura della clusterina umana. Lo studio di modelling prevede 2 domini ad α -elica “coiled-coil” (in verde) e tre domini ad α -elica antipatici (in blu). I 6 potenziali siti di glicosilazione sono indicati come punti gialli.

La catena aminoacidica della clusterina contiene almeno tre segnali di localizzazione nucleare (NLS), il primo tra i residui 74 e 81, il secondo tra i residui 324 e 340 (62) e il terzo tra i residui 442 e 446 (63). La struttura cristallografica di questa proteina non è stata ancora risolta, probabilmente a causa del fatto che contiene strutture “molten globule-like” e per la sua promiscua affinità di legame con un elevato numero di molecole, come è stato evidenziato in vitro (64).

Il ruolo biologico della clusterina e il suo coinvolgimento nell'attivazione e/o soppressione tumorale

La clusterina è in grado di interagire *in vitro* con un numero elevato di molecole come lipidi, proteine amiloidi, componenti del complesso d'ancoraggio alla membrana ed immunoglobuline; il suo livello d'espressione è direttamente correlato con fenomeni d'accrescimento cellulare, apoptosi, stress cellulare e fenomeni neurodegenerativi (65). Per questa proteina sono state descritte funzioni di chaperone (66,67), di protezione di membrana e di inibizione del complemento (68). In particolare, l'espressione di clusterina nell'interfaccia epitelio-matrice viene interpretata come meccanismo citoprotettivo verso insulti extracellulari (69). In alcuni sistemi sperimentali sembra infatti modulare l'eliminazione dei detriti cellulari tramite interazione con macrofagi (70). La clusterina è presente in due forme: la forma secreta (sCLU) e la forma troncata nucleare (nCLU) di 45kDa, che induce apoptosi (71). Il rapporto sCLU: nCLU sembra essere determinante per la sopravvivenza cellulare. Il Dr. E. Kolettas, ha condotto studi su cheratinociti umani HaCaT mutanti per p53 esposti al solfato di vanadile (VOSO_4), riscontrando che il processo di morte cellulare programmata è correlato all'overespressione di c-fos, una diminuzione nell'espressione di Bcl-2, dell'attività caspasicca e del valore del rapporto sCLU:nCLU. Inoltre l'overespressione di c-fos e v-fos determina la stessa risposta in cellule HaCaT wild type. Infine, da questo studio è emerso che se da una parte l'overespressione di sCLU non è sufficiente per proteggere le cellule dall'effetto del solfato di vanidile,

contemporaneamente l'overespressione di nCLU induce morte cellulare programmata (72) (Fig.4).

Martin Gleave e collaboratori hanno focalizzato la loro attenzione sul ruolo antiapoptotico della clusterina. Diversi studi eseguiti su linee cellulari tumorali prostatiche hanno evidenziato come la forma secreta sCLU svolga un ruolo citoprotettivo, conferendo alle cellule resistenza nei confronti dei convenzionali metodi terapeutici (73, 74, 75, 76) da Gleave). Gleave ha messo a punto uno studio di clinical trials eseguito su pazienti con cancro prostatico localizzato mediante l'impiego di oligo antisenso (AS clusterin ODN) anticlusterina (77). In un pannello di 80 oligo, l'utilizzo dell' oligo antisenso OGX-011, somministrato ad intervalli regolari via intravenosa per 29 giorni totali, ha determinato una riduzione del 90% dell'espressione di sCLU, con consecutivo ritardo nella progressione androgeno-indipendente di questa forma tumorale (77). Studi condotti da Bettuzzi e collaboratori hanno dimostrato come la sovra-espressione di questa glicoproteina sia in grado di determinare un rallentamento del ciclo cellulare in cellule epiteliali immortalizzate di prostata umana (78) e come l'accumulo dell' isoforma di clusterina di 45 KDa nel nucleo sia un evento associato con l'innesco del processo di morte cellulare programmata, in seguito a distaccamento cellulare dalla matrice (anoikis) (79, 80).

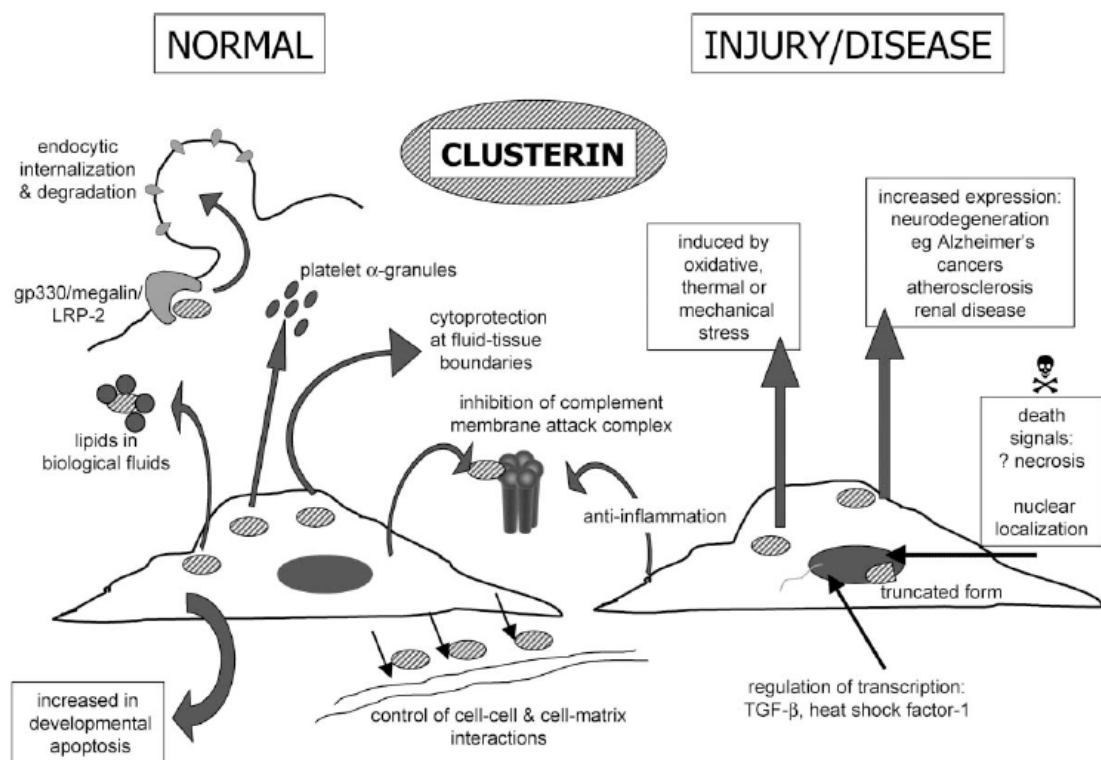
L'espressione di clusterina è stata associata con la progressione di diversi tumori umani, quali quello della vescica (81), colon (82), prostata (83, 84, 85), seno (86), e reni (87). Inoltre il coinvolgimento della clusterina nei meccanismi di riparazione del

DNA suggerisce un suo ruolo specifico nella regolazione dell'avanzamento, accrescimento o regressione di varie forme tumorali (88).

Sono stati infine evidenziati per questo gene sia effetti anti-apoptotici (89, 90, 91, 92), sia ruoli pro-apoptotici (93, 94, 95, 96).

Il promotore del gene della clusterina contiene alcuni elementi regolatori tessuto-specifici, altamente conservati (AP-1, AP-2 e Sp1, NF1) (97, 98, 99, 100); il sito AP-1 è stato identificato come elemento di risposta del fattore di crescita tumorale TGF- β (101), del fattore della crescita delle cellule nervose (NGF) e del fattore della crescita epidermico (EGF) (102) in cellule CCL64 e PC12. Una specifica sequenza altamente conservata di 14 bp è riconosciuta dall'heat shock transcription factor 1 (HSF1) che, una volta attivato, induce trascrizione (103). Il gene della clusterina interagisce con diverse citochine e fattori di crescita rispondendo a diversi agenti ,che inducono stress cellulare e morte cellulare programmata. Da quanto detto fin'ora emerge che il cambiamento nell'espressione della clusterina e' un'importante indicatore di stress ossidativo in cellule di mammifero (104) e che la clusterina gioca un ruolo importante nella instabilità genomica (105, 106, 79) sia durante la progressione tumorale che in condizioni patologiche specifiche (Alzheimer, malattie a carattere infiammatorio, attacchi cardiaci). Lo stesso rapporto sCLU:nCLU sembra essere cruciale nel determinare la sopravvivenza e progressione delle cellule tumorali.

Anche in cellule di neuroblastoma, la clusterina e' una proteina di secrezione ampiamente espressa (107).



S.E. Jones, C. Jomary / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34 (2002) 427–431

Fig 4 : Le funzioni biologiche della clusterina

Studi eseguiti su topi “knockout” per la clusterina (Clu -/-) hanno evidenziato il duplice ruolo di questa proteina ubiquitaria: l’assenza di clusterina ha un’effetto protettivo in cellule neuronali danneggiate in seguito ad ipossia-ischemia, mentre determina un peggioramento del danno al cuore in un modello di miocardite autoimmune (108, 109). E’ possibile che questa duplice azione pro o anti-apoptotica sia dipendente dal contesto cellulare come accade già per altre molecole come p-53 o Bcl-x (110). L’aumento dei livelli d’espressione del RNA messaggero e della proteina, *in vitro* e *in vivo*, sono stati rilevati in diversi tessuti sottoposti a stress come cuore, cervello, reni, fegato e tessuti della retina.

Per quanto riguarda la sua espressione nei tessuti tumorali sono stati riportati aumenti (111, 112) o diminuzioni (113, 114, 115) della sua espressione, a seconda del tipo di tessuto, di tumore e di approccio sperimentale. Risultati contrastanti sono stati osservati studiando il suo ruolo nel ciclo cellulare. In alcuni casi si è osservata una significativa relazione tra clusterina e progressione cellulare (113). Studi condotti dal gruppo di ricerca del Prof. Saverio Bettuzzi (Universita’ degli Studi di Parma, Italy) hanno evidenziato come il silenziamento di sCLU mediante l’impiego di siRNA sia correlato con la progressione del ciclo cellulare (114). Inoltre è stato osservato che topi TRAMP (un ceppo transgenico di animali che sviluppa spontaneamente il tumore alla prostata) incrociati con topi “knockout” per la clusterina, sviluppano un cancro prostatico molto aggressivo. In contrasto con questi dati, altri ricercatori hanno dimostrato un coinvolgimento della sCLU nella proliferazione tumorale. La Dr. Sabina Pucci, ad esempio, ha evidenziato la presenza di alti livelli di sCLU nei campioni di siero raccolti

da pazienti affetti da tumore coloretale. In questo particolare tipo di tumore l'interluchina 6 (IL-6) e il fattore di crescita endoteliale vascolare A (VEGF-A) influenzano la proliferazione delle cellule tumorali, favorendo la migrazione cellulare ed una porgressione del cilco cellulare grazie anche all'interazione con il complesso proteico Ku70-CLU-Bax. Questa interazione e' modulata da IL-6 che insieme a VEGF-A inbisce la morte cellulare dipendente da Bax, incrementa l'espressione di sCLU, promuovendo cosi' la sopravvivenza cellulare e la progressione tumorale (115).

3. IL RUOLO DELLA CLUSTERINA NEL NEUROBLASTOMA

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno messo in evidenza la capacità della clusterina di regolare negativamente NF- κ B (116), un fattore trascrizionale che è attivato in differenti tipi di tumore (117, 118). NF- κ B è un dimero composto da due subunità, p65 e p50, trattenuto nel citoplasma da un regolatore negativo denominato I- κ B. Quando I- κ B è fosforilato, viene degradato, rilasciando quindi NF- κ B che entra nel nucleo e attiva la trascrizione dei suoi geni bersaglio, caratterizzati dalla presenza del motivo κ B nella sequenza del promotore o enhancer. NF- κ B è un'oncoproteina che regola molteplici funzioni cellulari quali: apoptosi, proliferazione, motilità cellulare, angiogenesi, trasformazione e resistenza ai farmaci (119, 120-123).

La clusterina regola l'attività di NF- κ B attraverso il controllo diretto dell'espressione dell'inibitore I- κ B.

In studi condotti in fibroblasti embrionali murini è stato visto che la delezione genetica di clusterina causa una drastica riduzione nei livelli della proteina I- κ B, determinando di conseguenza un aumento nell'attività di NF- κ B che, a sua volta, induce un'incremento della trascrizione di c-IAP, uno dei geni bersaglio di NF- κ B, e una riduzione nei livelli di p53 (116).

Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione ectopica della clusterina causa una

drastica riduzione nell'invasività di cellule tumorali di neuroblastoma *in vitro* (124).

Questi dati suggeriscono un ruolo determinante della clusterina nell'inibizione di NF- κ B e nella soppressione della motilità cellulare tumorale.

Studi condotti nel laboratorio di Arturo Sala, Thomas-Tikhonenko e Saverio Bettuzzi hanno evidenziato che la delezione genetica di clusterina determina un'incremento dell'incidenza di neuroblastomi in un modello murino (82).

Infine, l'espressione della clusterina è stata studiata in neuroblastomi umani metastatici. In queste forme tumorali più aggressive, la proteina è espressa a livelli molto bassi fino ad essere completamente assente.

Questi dati sono di notevole importanza nel sostenere la teoria secondo la quale la clusterina è un soppressore tumorale.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Le cellule SH-SY5Y sono cellule neuroepiteliali di neuroblastoma umano, provenienti da metastasi al midollo osseo. Questa linea cellulare, considerata un modello di neuroblasti, deriva da subclonazioni di cellule SK-N-SH (linea cellulare ottenuta da un tumore osseo metastatico). Le cellule SH-SY5Y sono geneticamente caratterizzate da una delezione presente sul cromosoma 1. L'amplificazione del protooncogene MYCN non è riscontrabile in questa linea cellulare. Le SH-SY5Y sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagles medium, GIBCO) contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS).

I cloni stabili SH-SY5Y-MYCN e SH-SY5Y empty sono cellule di neuroblastoma stabilmente transfettate, rispettivamente con un vettore d'espressione in grado di esprimere MYCN (pCDNA 3.1-MYCN) o con il vettore d'espressione vuoto (pCDNA 3.1). Le cellule crescono in DMEM contenente il 10% di FBS e 0.8 mg/ml di G418 (Geneticina, GIBCO).

Le cellule HEK-293 derivano dalla trasformazione di cellule umane di fegato d'embrione con il DNA adenovirus 5 e sono state descritte per la prima volta nel 1977 da Graham et al. In questa linea cellulare il protooncogene MYCN è poco espresso. Le cellule crescono in DMEM contenente il 10% di FBS.

Le cellule umane LAN-1 derivano da metastasi di neuroblastoma e sono caratterizzate dall'amplificazione di MYCN. Crescono in DMEM contenente il 10%

di FBS e l' 1% di NEAA (GIBCO, MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10mM).

Le cellule Kelly sono cellule di neuroblastoma umano caratterizzate dall'amplificazione del gene MYCN. Crescono in RPMI-1640 (GIBCO), contenente il 10% di FBS, 1% di L-glutamina al 1% e 1% di Penicillina /Streptomicina (GIBCO) al 1%.

Le cellule TET-21N, forniteci dal laboratorio del Prof. Giovanni Perini (Università degli Studi di Bologna), sono cellule di neuroblastoma transfettate stabilmente con un transattivatore tTA(tetracycline-controlled transactivator protein) e con un vettore d'espressione per MYCN.

Le cellule crescono in DMEM, contenente il 10% di FBS, 2mM L-glutamina e 50 ug/ml gentamicina. Per selezionare le cellule contenti il sistema TET OFF si usano 200 ug/ml di G418 e 150ug/ml di Igromicina B (Invivogen- Autogen Bioclear UK Ltd). Per spegnere l'espressione di MYCN vengono aggiunti al terreno di coltura 50 ug/ml di Tetraciclina (Tetracycline solution 12,5 mg/ml- Bioline).

In tutti i casi le cellule sono cresciute a 37 °C in un'atmosfera al 5% di CO₂.

Saggio colorimetrico

La vitalità cellulare è stata determinata con il test d'esclusione del Trypan Blue. Brevemente, le cellule sono state raccolte mediante tripsinizzazione e successivamente

centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in PBS 1X. Ogni campione è stato diluito con il Trypan Blue (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in un rapporto 1:1 e le cellule negative al colorante (vitali) sono state contate tramite emocitometro. La vitalità è stata determinata come percentuale di cellule vive (bianche) sul totale di cellule (bianche + blu) ai vari tempi indicati. Tre differenti campi contenenti all'incirca 150 cellule sono stati scelti in maniera casuale per ogni punto sperimentale.

Trattamento con farmaci epigenetici

Diverse linee cellulari di neuroblastoma (SH-SY5Y, LAN-1, IMR-32 e LN-1 stabilmente trasfettate con i vettori d'espressione pSUPER.gfp+neo.Clu e pSUPER.gfp+neo.Scr, Kelly) sono state seminate ad una densità di 5×10^4 cellule/well o $2,1 \times 10^6$ cellule/dish e a 24h dalla semina sono state trattate con differenti farmaci epigenetici per 24h, 48h e 72h. I farmaci epigenetici usati sono:

1. Tricostatina A (TSA)= farmaco appartenente alla classe degli inibitori dell'istone deacetilasi
2. Acido valproico (VPA)= inibitore dell'enzima istone deacetilasi 1
3. 5'-aza- 2'- deoxycytidine (AZA)= appartenente alla classe degli agenti demetilanti in grado di inibire DNMT

I 3 farmaci sono stati acquistati dalla SIGMA (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ed usati singolarmente o in combinazione a diverse concentrazioni:

TSA	VPA	AZA	AZA+TSA	TSA+VPA
1uM	1,5mM	10uM	10uM+0,5uM	1.0uM+1.5mM

Saggi di Western blot, analisi del ciclo e della proliferazione cellulare, sono stati eseguiti sulle cellule di neuroblastoma trattate con i tre differenti farmaci epigenetici.

Western blotting

Le cellule sono state raccolte nel buffer di lisi RIPA (50 Mm Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, sodio deoxycholate, 1% NP-40, 0,1% SDS, miscela di inibitori di proteasi e fosfatasi 1pastiglia/10 ml) a 4°C per 15 minuti. Le cellule sono state centrifugate a 13.200 rpm per 15 minuti a 4°C e il sopranatante recuperato. Per la determinazione della concentrazione proteica è stato usato il metodo Bradford (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) utilizzando come standard la BSA(albumina di siero bovino, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA). L'assorbanza e' stata misurata a 595 nm. 20-25 ug di estratto proteico ,sono stati miscelati 1:1 con SDS-loading buffer 4X e denaturati a 100°C per 5 minuti, prima di essere separati mediante elettroforesi su gel di SDS-poliacrilamide al 10% e successivamente trasferiti su membrane Hybond-C extra (Amersham Biosciences) per 1 ora e 30 minuti a 80 Volt in camera fredda. Il protocollo di rivelazione prevede 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente in blocking solution 1% (PBS 1X, 0,1% NP-40, 5 gr latte magro in polvere), ibridazione con anticorpo primario in

blocking solution 1%, seguita da 2 lavaggi da 10 minuti ciascuno con 0,1% NP-40 in PBS 1X e da ibridazione con anticorpo secondario anti-mouse o anti-rabbit (GE Healthcare, UK) o anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA) diluito 1:10.000 in blocking solution 1% per 30 minuti a temperatura ambiente ed infine 2 lavaggi da 5 minuti ciascuno in PBS 1X con 1% NP-40. La rivelazione per chemiluminiscenza è stata eseguita con pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Thermo Scientific). Gli anticorpi primari impiegati sono i seguenti: mouse anti-clusterina umana (diluito 1:1000, Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY, USA), goat polyclonal IgG 200ug/ml anti-clustaina β (diluizione 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA); mouse monoclonal IgG_{2A} 200ug/ml anti-MYCN (diluito 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA).Gli anticorpi secondari ECL anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase liked whole Anntibody (from donkey) e ECL anti-mouse IgG Horseradish peroxidase liked whole Anntibody (from sheep) sono stati acquistati presso la GE Healthcare (GE Healthcare, UK) e da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA) ed utilizzati ad una diluizione di 1:10000. Il caricamento uniforme dei campioni su gel e l'efficienza di trasferimento su membrana (blottaggio) dei campioni proteici è stato verificato con colorazione Red Ponceau (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e mediante l'impiego dell'anticorpo primario goat polyclonal IgG 200ug/ml anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA), usato come controllo.

Vettori d'espressione

Il cDNA di MYCN umano è stato estratto mediante l'impiego degli enzimi di restrizione XbaI e EcorI (Promega Biosciences, Promega Corporation San Luis Oispo, CA USA) dal vettore d'espressione pSP64CRNX-3 (fornito da Bill Weiss) e successivamente subclonato nel vettore d'espressione pcDNA 3.1(+)/His (Invitrogen).

Il promotore umano di clusterina (CLU) è stato ottenuto per amplificazione da PCR di genoma umano mediante l'impiego dei seguenti primers:

FW 5' CGACTGGTAC|CCTGTGTGTGCTCTCTTCTCCAGCA 3' (con sito di restrizione per KpnI)

Rw 5' TTCGATCGA|ATTGGGGCTGGCTGCAAACCTG 3' (con sito di restrizione per HindIII). Il prodotto di PCR è stato estratto da gel e subclonato in pCRII-TOPO Vector mediante l'impiego del kit TOPO TA Cloning Kit (Dual Promoter-no manual with One Shot TOP 10F' Chemically Competent E.Coli, Invitrogen) che prevede l'impiego di 1mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e dello 0,01% di 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-Gal, Biochemika, Fluka, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (W/V) per la selezione delle colonie batteriche ricombinanti bianche, seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice (Invitrogen)

Il promotore della clusterina è stato estratto dal TOPO vector mediante l'impiego degli enzimi di restrizione KpnI in 5' e HindIII in 3' (Roche, La Roche Ltd, Germany) ed inserito in un vettore di luciferasi pGL2-Promoter Vector (Promega Biosciences, Promega Corporation San Luis Oispo, CA USA) precedentemente

tagliato con gli stessi enzimi KpnI e HindIII. Il vettore pGL2-Promoter Vector e' stato utilizzato come vettore di controllo nel saggio di luciferasi.

Il primer siRNA per la clusterina e il primer siRNA per la sequenza scramble (controllo) sono stati clonati in un vettore pSUPERgfp+neo (OligoEngine) (Olesya Chayka) e successivamente trasfettati in differenti linee cellulari di neuroblastoma.

Sequenza del siRNA per la clusterina (Clu):

GATCCCCAGGAAGAACCCTAAATTTATTCAAGAGATAAATTTAGGGTTCT
TCCTTTTTGGAAAGGGTCCTTCTTGGGATTTAAATAAGTTCTCTATTTAAATCCCA
AGAAGGAAAAACCTTTTCGA

Sequenza del siRNA per il controllo (Scr):

GATCCCCGGTTTATATGATCTTCATATTCAAGAGATATGAAGATCATATA
AACCTTTTGGAAAGGGCCAAATATACTAGAAGTATAAGTTCTCTATACTTCTAGT
ATATTTGGAAAACCTTTTCGA

Ogni plasmide è stato sottoposto a sequenziamento per verificare l'assenza di mutazioni nei cDNA inseriti.

Mutagenesi sito-diretta con oligonucleotidi e PCR

Il vettore pGL2-CLU e' stato modificato nella sequenza E-BOX (CGCGT= sito di legame per MYCN) mediante l'impiego di un kit di mutagenesi sito diretta in vitro (QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, STRATAGENE, Agilent Technologies Company, CA) seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice.

Brevemente, il vettore pGL2-CLU e' stato amplificato per PCR mediante l'impiego di primer mutati nella corrispettiva sequenza E-BOX:

FW:5'-TCCCAGATGGGTCTGCTAGTTCAGGCTCTTCCCTACTGGA-3'

RW:5'-TCCAGTAGGGAAGAGCCTGAACTAGCAGACCCATCTGGGT-3'

Il prodotto di PCR e' satato trasformato in batteri competenti XL10-Gold.

La selezione delle colonie batteriche bianche e' avvenuta mediante l'impiego di 1mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e dello 0,01% di 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (X-Gal, Biochemika, Fluka, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (W/V).

Ogni plasmide è stato sottoposto a sequenziamento.

Saggio di attivita' luciferasica

Cellule di neuroblastoma SH-SY5Y sono state trasfettate transientemente con il vettore di luciferasi pGL2 Promoter Vector (Promega Biosciences, Promega Corporation San Luis Oispo, CA USA), contenente o il promotore della clusterina *wild type* (pGL2-CLU WT) o il promotore della clusterina mutato nella sequenza E-BOX (pGL2-CLU MUT), un vettore di controllo Renilla (Promega Biosciences, Promega Corporation San Luis Oispo, CA USA) e il vettore pcDNA3.1(+)/His contenente il cDNA per MYCN (CMV-MYCN). Per ogni trasfezione sono state seminate $0,4 \times 10^6$ cellule/well, in una piastra da 12 well.

A 24h dalla trasfezione e' stata misurata l'attivita' luciferasica in presenza o in assenza di MYCN, rispetto al controllo di riferimento, che determina l'efficienza di trasfezione

mediante l'utilizzo del kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega Biosciences, Promega Corporation San Luis Obispo, CA USA) ,seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. L'emissione di luce e' stata normalizzata rispetto al vettore di controllo, esprimente la luciferasi, Renilla.

Trasfezione stabile e transiente

Le trasfezioni stabili e transienti delle due linee cellulari di neuroblastoma 293 e SH-SY5Y con il vettore d'espressione pCDNA3.1(+)/MYCN sono state effettuate usando il reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ,seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. Per ogni trasfezione sono state seminate 5×10^4 cellule/well o $2,1 \times 10^6$ cellule/dish e successivamente trasfettate transientemente con 2 ug di DNA plasmidico e stabilmente con 15 ug di DNA plasmidico. L'efficienza di trasfezione è stata valutata calcolando le cellule positive alla GFP (proteina a fluorescenza verde) in seguito alla trasfezione del vettore pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc., East Meadow Circle, Palo Alto, CA, USA). In ogni esperimento l'efficienza di trasfezione è sempre risultata superiore al 50% del numero totale di cellule presenti in coltura.

Per i cloni stabili SH-SY5Y/MYCN e' stata ottenuta una popolazione mista dopo 3 settimane in selezione con 0.8 mg/ml G418 (Gibco).

Le due linee cellulari IMR-32 e LAN-1 sono state trasfettate stabilmente con i due plasmidi pSUPER.gfp+neo.Clul e pSUPER.gfp+neo.Scr usando il reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) come precedentemente descritto. Le cellule sono

state mantenute in selezione con 2.4 mg/ml G418 per le IMR-32 e 1.2 mg/ml per le LAN-1, per 3 settimane per ottenere cloni singoli.

Saggio di Immunoprecipitazione della cromatina (ChiP assay)

Il saggio di immunoprecipitazione della cromatina e' stato eseguito su 3 differenti linee cellulari di neuroblastoma: LAN-1 (MYCN amplificato), SH-SY5Y MYCN (cloni stabili contenenti MYCN) e TET 21N ON o OFF (cellule esprimenti o non esprimenti MYCN). Per la frammentazione della cromatina e' stato seguito il protocollo (PROT11) disponibile sul sito <http://www.epigenome-noe.net/>.

Brevemente, le cellule vengono raccolte ad una densita' pari a $2-5 \times 10^7$ / T75 e risospese in 27 ml di mezzo fresco DMEM con il 10% di FBS. Vengono fissate con l'aggiunta di 3 ml di formaldeide (Formaldehyde solution for molecular biology, 36.5-38% in H₂O, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ed incubate per 30 minuti a RT (temperatura ambiente).

La reazione viene bloccata con l'aggiunta di 3 ml di glicina 1,375 M. Le cellule vengono lavate con PBS 1X e sucessivamente centrifugate a 1200 rpm per 3 volte ed infine risospese in 3 ml di Swelling buffer (25M Hepes pH 7.8, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1% NP-40, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, protease Inhibitor Cocktail). Dopo un'incubazione di 10 minuti in ghiaccio le cellule vengono frantumate con l'omogenizzatore Dounce in ghiaccio per 25 volte e centrifugate immediatamente a 2000 rpm per 5 minuti. Il pellet, che contiene la frazione nucleare, viene risospeso in

2-3 ml di Sonication Buffer (50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1 % Na- deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, Protease Inhibitor Coctail). Per tutte e tre le linee cellulari la cromatina e' stata sonicata per 15 cicli della durata di 45 secondi l'uno ad una potenza pari al 60% (Vibra Cell Sonicator) ed infine centrifugata a 14000 rpm per 15 minuti. Da questa separazione viene recuperato solo il sopranatante, contenente la cromatina solubile, che viene poi conservata a -80C. La cromatina verra' sucessivamente immunoprecipitata con due anticorpi: il primo e' un mouse monoclonal IgG_{2A} 200ug/ml anti-MYCN (, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA) e il secondo e' un mouse monoclonal IgG_{2A} 100ug/ml anti-GAL-4 (controllo negativo, 100ug/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca USA). Il complesso antigene/anticorpo viene precipitato mediante l'impiego di biglie magnetiche (Chip -IT Express Kit Active Motif, Active Motif Europe, Germany) seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. Infine la cromatina immunoprecipitata e' stata amplificata con primer specifici per la regione del promotore di Clusterina contenente le E-BOX (FW: 5'-TTGTGTCTTGGACTGGGACA-3'; RW: 5'-GAAAGCAAGGGGAGCTTTCT-3') e corsa su gel d'agarosio al 2% per 45-50 minuti. Le dimensioni del prodotto di PCR e' di 220 bp.

Analisi del ciclo cellulare mediante l'impiego del Citofluorimetro (Analisi al FACS)

Per ogni analisi del ciclo cellulare sono state piastrate 5×10^4 cellule/well e la raccolta

e' avvenuta a 24 ore dalla semina.

Brevemente, le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti. Il pellet viene lavato in PBS 1X con l'aggiunta di BSA 1:1000 e centrifugato per 10 minuti a 1500 rpm. Le cellule sono state poi fissate in EtOH al 70% e conservate a - 20C. Prima dell'analisi al Citofluorimetro le cellule vengono centrifugate per 5 minuti a 2000 rpm e risospese in PBS1X con l'aggiunta di BSA 1:1000 e Rnase 1:1000, e incubate a 37C per 1 ora.

Al termine dell'incubazione viene eliminato il sopranatante tramite centrifugazione e il pellet risospeso in PBS 1X con l'aggiunta di BSA 1:1000 e Propidio Ioduro 50 ug/ml (PI, intercalante del DNA) . Il PI e' un fluorocromo intercalante del DNA, appartenente alla famiglia dei fenantridinici le cui molecole presentano la caratteristica di non essere fluorescenti quando sono libere nel solvente, mentre sviluppano un'elevata efficienza quantica quando si trovano intercalati nella doppia elica del DNA.

Per quanto riguarda le caratteristiche spettrali, il PI ha una larga banda di assorbimento nel visibile, con un massimo nel verde. Il PI puo' essere rivelato sia con strumenti dotati di luce laser Argon a 488 nm, sia con una strumentazione a lampada ai vapori di mercurio. Lo spettro di emissione e' localizzato nel rosso con un massimo ad una lunghezza d'onda di 610 nm.

Il PI non ha specificita' assoluta per il DNA, ma si lega a qualsiasi coppia di basi, quindi e' in grado di intercalare anche l'RNA a doppia elica e proprio per questa

ragione, ogni analisi deve sempre essere preceduta da una preventiva digestione enzimatica dell'RNA.

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita utilizzando un citometro LSRII (Becton Dickinson) dotato di un sistema di eccitazione a quattro laser (488-nm, 633-nm, 405-nm e 355-nm). La luce viene trasmessa tramite fibre ottiche ad un ottagonio di detector contenente una serie di fotomoltiplicatori e filtri Bandpass.

Inoltre l'LSRII è provvisto di un modulo per la discriminazione dei , che processa gli impulsi analizzando l'area in FL2 (FL2-A) (che per i doppietti è maggiore che per le cellule tetraploidi) in funzione del picco FL2 (FL2-W). Pertanto, in una rappresentazione biparametrica di FL2-A in funzione di FL2-W, la popolazione delle cellule aggregate è distinta dalle cellule tetraploidi.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo v8.6.3 (Becton Dickinson).

Saggio di Invasività cellulare

Il saggio di invasività cellulare *in vitro* è stato eseguito sulle cellule di neuroblastoma LAN-1 SH CLU 1-2 (cloni stabili esprimenti un sh RNA contro la clusterina) e LAN-1 SH CONTROL 1-2 (cloni stabili esprimenti un sh RNA scramble).

Ciascuna cameretta di invasività è costituita da due compartimenti sovrastanti, separati da una membrana porosa attraverso cui, applicando un gradiente

chemiotattico, e' possibile indurre la migrazione delle cellule. La porosità della membrana e' in funzione della dimensione delle cellule e deve essere tale da impedire il passaggio passivo delle cellule, ma favorire la loro migrazione attiva.

Brevemente, le cellule trattate per 24h con TSA (1uM) o VPA (1.5mM) sono state raccolte ad una densità di 2.5×10^4 /well in 500 ul di DMEM e piastrate in una cameretta di invasività cellulare (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber, BD Biosciences) precedentemente reidratata per 2 h a 37°C . La base della cameretta e' stata riempita con DMEM contenente il 10% di FBS (500 ul), che svolge il ruolo di chemio-attraente. Dopo 22 h a 37°C, le cellule presenti sulla parte inferiore della membrana sono state fissate in MetOH al 100% e colorate con 0.2% di Crystal Violetto in EtOH al 2%. La conta cellulare e' avvenuta al microscopio ottico, in triplicato per ogni campione. I dati sono stati espressi in percentuale di invasività attraverso la membrana rispetto al controllo valutato come 100% di invasività cellulare.

RISULTATI

1. LIVELLO D'ESPRESSIONE DI CLUSTERINA IN TUMORI UMANI E NEUROBLASTOMA

Nel nostro laboratorio stiamo lavorando all' ipotesi che la clusterina possa essere un nuovo soppressore tumorale regolato negativamente da alcuni oncogeni. L'osservazione iniziale e' stata fatta tramite lo screening di microarrays eseguiti su diversi tumori umani, nei quali e' stata osservata la diminuzione dei livelli d'espressione della clusterina (Fig.5). Abbiamo poi osservato la diminuzione dell'espressione dell'mRNA di ApoJ/clusterina in neuroblastomi in cui il gene MYCN e' amplificato (Fig.6).

P-Value Threshold: 1E-4		+	-		Outlier Rank Threshold: 50							+	-
	Normal vs. Normal	Cancer vs. Normal	Cancer vs. Cancer		Histologic Subtype	Tumor Stage	Molecular Alteration	Misc	Tumor Grade		Outlier		
Adrenal Gland	1												
Brain	2	4	1 2					1					
Ciliary Ganglion	1												
Dorsal Root Ganglia	1												
Dorsal Root Ganglion	1												
Spinal Cord	2												
Testis	2												
Tonsil	1												
Trigeminal Ganglion	1												
Leukemia			1 1	2 1			4 2	1			3		
Lung		3	2 1										
Lymphoma			2 3					1			1		
Multi-cancer		1	4 2										
Ovarian			1										
Prostate		5	1 3					1 6	1				
Sarcoma			6 6			1		2					
Bladder		1				1							
CellLine							1	6 3					
Normal								1 1					
Parathyroid								1					
Renal			1					1					
Blood	1												
Bone Marrow	1												
Breast		1	1				2	2	4				
Colon		1	1										
Early Progenitor Cells	1												
Head-Neck		1											
Kidney	1												
Liver		1	1										
Melanoma		1											
Neuroblastoma								2					
Others		1											
Placenta	2												
Seminoma		1											
Skeletal Muscle	1												
Skin	1												
White Blood Cells	1												

Fig 5:

livello d'espressione della clusterina nei tumori umani

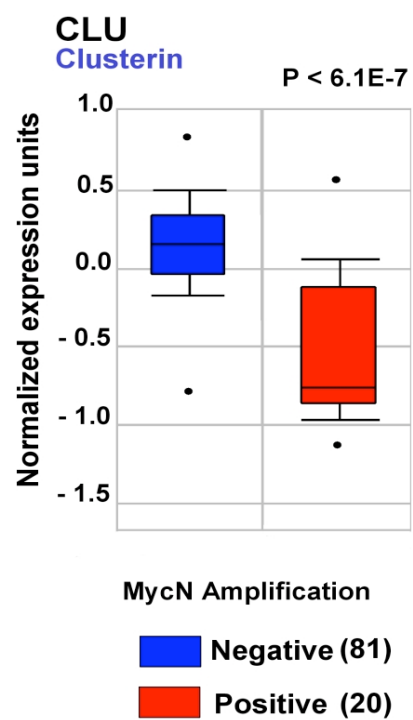


Fig 6:

downregolazione dei livelli d'espressione del mRNA della clusterina in presenza di MYCN amplificato in neuroblastomi umani.

2. CALO DEL LIVELLO D'ESPRESSIONE DI CLUSTERINA IN PRESENZA DI MYCN

Per verificare la correlazione tra CLU e MYCN abbiamo trasfettato alcune linee cellulari umane di neuroblastoma, transientemente o stabilmente, con un vettore d'espressione contenente il cDNA di MYCN. Il livello d'espressione proteico e del mRNA di clusterina sono stati analizzati mediante saggi di Western Blotting (Fig.7) e PCR semiquantitativa (Fig.8). Dai dati ottenuti e' emerso che la clusterina e' negativamente regolata da MYCN. MYCN e' un fattore di trascrizione che, in maniera simile agli altri membri della famiglia MYC, e' in grado di regolare l'espressione dei suoi geni target indirettamente, mediante il reclutamento di altre molecole o direttamente via legame sequenza-specifico con il promotore del gene bersaglio (124).

Anche nel caso di ApoJ/clusterina la riduzione nei livelli del mRNA, in seguito ad una acuta overespressione di MYCN ,sembra essere causata da una interazione diretta a livello del promotore della clusterina, come verra' dimostrato nel capitolo successivo.

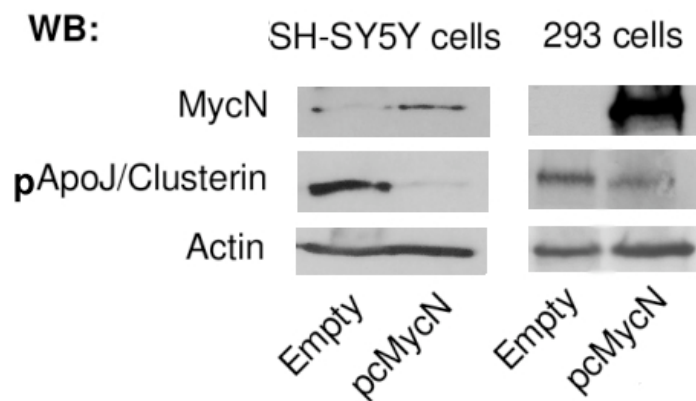


Fig 7 :

Saggio di Western blot :

Cellule 293 trasfettate transientemente a 48h con il vettore d'espressione pcDNA 3.1 contenente il cDNA di MYCN (lane 2 o 3) o con il vettore vuoto (lane 1)

Cellule SH-SY5Y trasfettate stabilmente con il vettore d'espressione pcDNA 3.1 contenente il cDNA di MYCN (lane 1) o con il vettore vuoto (lane 2).

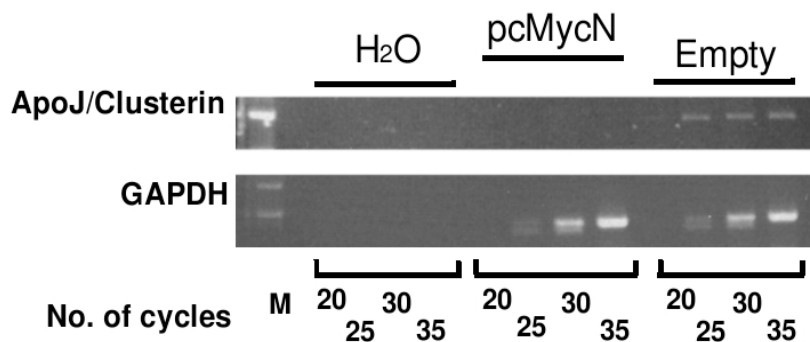


Fig 8 :

PCR semiquantitativa:

Saggio di quantificazione dell'espressione di ApoJ/clusterina in cellule SH-SY5Y stabilmente trasfettate con un vettore d'espressione pcDNA 3.1 vuoto o con il cDNA di NMYC (empty = clone stabile SH-SY5Y/pcDNA 3.1;nmyc2 = clone stabile SH-SY5Y MYCN 2) a 20,25,30 e 35 cicli

3.LA RIDUZIONE NEI LIVELLI D'ESPRESSIONE DELLA CLUSTERINA E' CAUSATA DA UN'INTERAZIONE

DIRETTA DI MYCN CON IL PROMOTORE DELLA CLUSTERINA

In studi precedenti eseguiti nel nostro laboratorio e' stato dimostrato che la clusterina e' negativamente regolata dal protooncogene MYCN attraverso l'attivazione del cluster miRNAs 17-92 (125).

Dall'analisi computazionale con l'algoritmo miRANDA (126) e' emerso che 4 dei 6 miRNAs del cluster miR17-92 sono possibili target per la clusterina e che l'attivita' di questi miRNAs e' regolata da c-Myc (127).

Si e' ipotizzato, quindi, che MYCN rivesta un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione di questo cluster. A conferma di cio', dati di Real-Time PCR hanno evidenziato l'overespressione di 2 dei 6 miRNAs, miR- 18a e miR- 19a in cellule epiteliali di neuroblastoma (SH-SY5Y) stabilmente trasfettate con un vettore d'espressione per MYCN (125).

Anche altri membri del cluster, miR-17-5p e miR-92, sono risultati essere overespressi in presenza di MYCN in differenti linee cellulari (128).

MYCN e' in grado di legare direttamente il promotore della clusterina

Parallelamente a quanto appena detto, e' possibile che MYCN possa regolare l'espressione della clusterina direttamente legandosi alle sequenze consenso (E-BOX) presenti sul promotore del gene stesso. Questa ipotesi e' supportata dalla presenza di diverse sequenze consenso E-BOX su tutto il gene della clusterina (Fig.9).

Clusterin promoter region

CACAAGGCCCTCTCCATCCCACCCTCATTATGTCTGACTCTTTACTATTTAA
ATGGGTCAAGAGAAGTGGCGCTTGTGTAATGTGAAGGTTAAGGTCAGTAG
GGCCAGGGAAGTGTGAGATTGTGCTTGGACTGGGACAAGACAGCCGGGCTAA
E-BOX FW clusterin →
C CGCGT GAGAGGGGCTCCCAGATGGG CACGCG AGTTCAGGCTCTTCCCTACT
E-BOX
GGAAGCGCCGAGCGGCCGCACCTCAGGGTCTCTCCTGGAGCCAGCACAGCT
ATTCGTGGTGATGATGCGCCCCCGGCGCCCCCAGCCCGGTGCTGCACCGG
← RW clusterin
CCCCACCTCCCGGCTTCC AGAAAGCTCCCCCTTGCTTTC CGCGGCATTCTTT
GGGCGTGAGTCATGCAGGTTTGCAGCCAGCCCCAAAGGGGGTGTGTGCGCG
AGCAGAGCGCTATAAATACGGCGCCTCCCAGTGCCACAACGCGGCGTCGC
CAGGAGGAGCGCGCGGGCACAGGGTGCCGCTGACCGGTGAGATGTCCCCGT
CTTCCCTACC.CATGATGGTCTCCTGTTCTCTGCAGAGGCGTGCAAAGACTCC
AGAATTGGAGGCATGATGAAGACTCTGCTGCTGTTTGTGGGGCTGCTGCTGA
CCTGGGAGAGTGGGCAGGTCTCTGGGGGACCAGACGGTCTCAGACAATGAGC
TCCAGG

Fig 9 :

promotore della clusterina; in rosa i due siti di legame(MYC BS1 e MYC BS2) per il fattore trascrizionale MYCN.In verde i primer usati per l'amplificazione dell'area del promotore con la E-BOX.

Interazione *in vitro* ed interazione *in vivo* di MYCN con la clusterina

Attraverso saggi di Gel-Shift *in vitro* (125) e saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChiP) *in vivo* abbiamo visto se MYCN interagisce con il promotore della clusterina.

Il saggio di mobilità elettroforetica (Gel-Shift) serve a studiare le interazioni *in vitro* tra presunti fattori trascrizionali e sequenze di DNA a doppia catena. Nel nostro laboratorio, il saggio e' stato eseguito su estratti nucleari ottenuti da cellule di neuroblastoma transientemente trasfettate con un vettore d'espressione per MYCN e ha evidenziato un'interazione *in vitro* tra MYCN e le E-BOX presenti nella regione 5' del gene della clusterina (Fig.10). La sonda utilizzata e' stata sintetizzata *in vitro*: un oligonucleotide di DNA a doppia elica che viene marcato terminalmente con P32 (125).

Il saggio di ChiP (129, 130) e' stato eseguito su 3 linee cellulari di neuroblastoma: LAN-1(MYCN amplificato), SH-SY-SY5Y stabilmente trasfettate con un vettore d'espressione contenente MYCN (pcDNA 3.1) e TET-21N transfettate stabilmente con un transattivatore tTA(tetracycline-controlled transactivator protein) e con un vettore d'espressione per MYCN. Anche *in vivo* MYCN e' in grado di interagire con il promotore della clusterina (Fig.11).

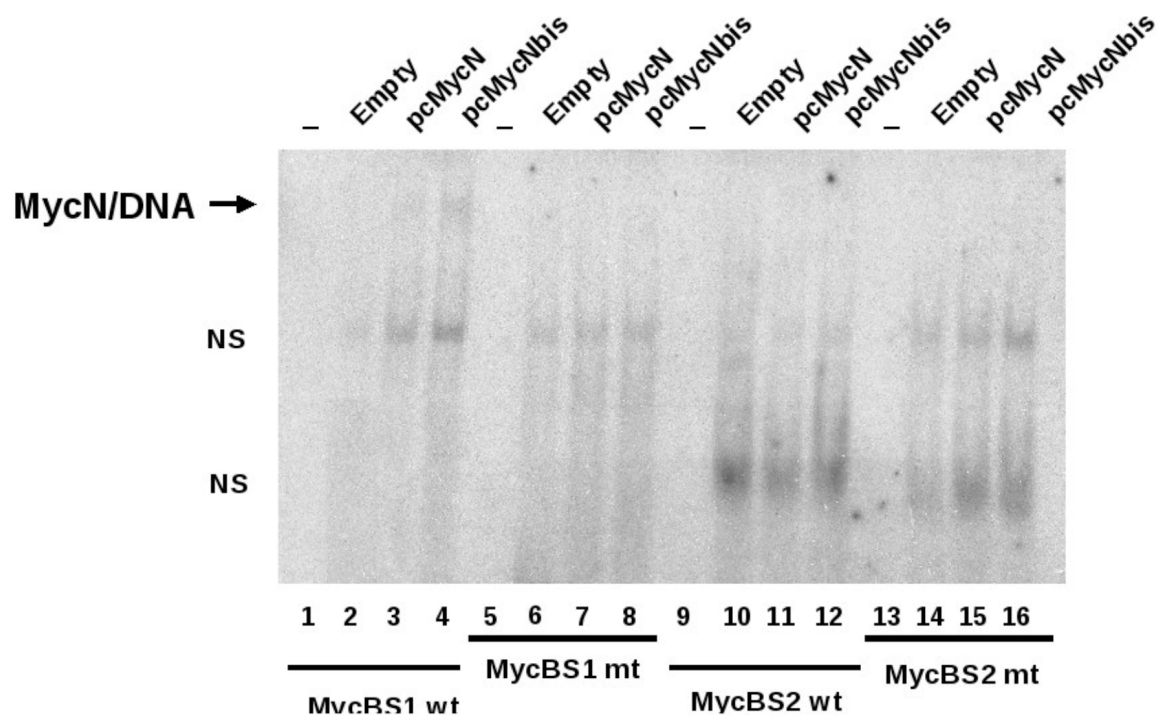


Fig 10 :

Gel-Shift eseguito su estratti nucleari ottenuti da cellule di neurinoblastoma transientemente trasfettate con un vettore d'espressione per MYCN.

Empty= 293 trasfettate transientemente con il vettore d'espressione vuoto

pcMYCN e pcMYCNbis= 293 trasfettate transientemente con il vettore d'espressione per MYCN in doppio.

Gli estratti nucleari sono stati marcati con sonde al ^{32}P contenenti un motivo consenso "wild type" (1,2,3,4,9,10,11,12) o mutato (5,6,7,8,14,15,16) per MYCN.

NS= complesso DNA-proteina aspecifico

1,9,13= senza sonda

L'interazione MYCN/DNA e' stata analizzata per le 2 sequenze consenso(E-BOX) presenti sul promotore di ApoJ/clusterina

MYCBS1= sequenza consenso numero 1

MYCBS2= sequenza consenso numero 2

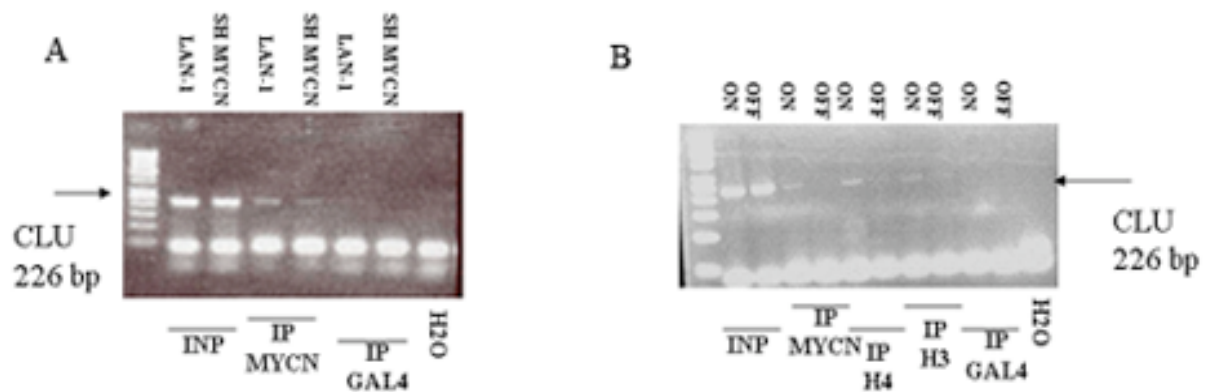


Fig 11 A-B :

Saggio di immunoprecipitazione della cromatina eseguito su 3 differenti linee cellulari.

11A: LAN-1 (MYCN amplificato) e SH-SY5Y MYCN (cloni stabilmente trasfettati con un vettore d'espressione contenente MYCN).

11B: TET-21N trattate (TET-OFF) o non (TET-ON) per 24h con 50 ug/ml di tetraciclina per lo spegnimento dell'espressione di MYCN.

La cromatina e' stata immunoprecipitata con un'anticorpo per MYCN e uno per GAL4 (controllo negativo) e amplificata con primer specifici per la regione del promotore di ApoJ/clusterina contenente le E-BOX.

Nel caso delle TET-21N la cromatina e' stata immunoprecipitata anche con un'anticorpo per l'istone H4 e l'istone H3.

MYCN e' in grado di regolare negativamente l'espressione della clusterina attraverso l' interazione diretta con la E-BOX presente sul promotore della clusterina

Dai dati ottenuti con il saggio di Gel Shift *in vitro* e di ChiP *in vivo* e' emerso che MYCN interagisce direttamente con la E-BOX del promotore della clusterina. MYCN e' un fattore trascrizionale che normalmente regola negativamente l'espressione dei suoi geni bersaglio in modo indiretto, reclutando altri fattori.

Per capire se, nel caso della clusterina, la regolazione negativa dell'espressione di quest'ultima e' direttamente dipendente dall'interazione di MYCN con la E-BOX abbiamo eseguito un saggio di attivita' luciferasica.

Le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y sono state trattate per 24h con un vettore di Luciferasi pGL2 Promoter Vector contenente il promotore della clusterina *wild type* (pGL2- CLU WT) oppure il promotore della clusterina mutato nella E-BOX (pGL2- CLU MUT), in presenza o meno di un vettore d'espressione per MYCN (CMV-MYCN). Quanto ottenuto mette in evidenza che solo nella condizione *wild type* (Fig.12) MYCN e' in grado di interferire con l'attivita' luciferasica, inibendola. Questo risultato conferma la nostra ipotesi secondo la quale MYCN e' in grado di regolare negativamente l'espressione della clusterina per interazione diretta con la E-BOX presente sul promotore della clusterina.

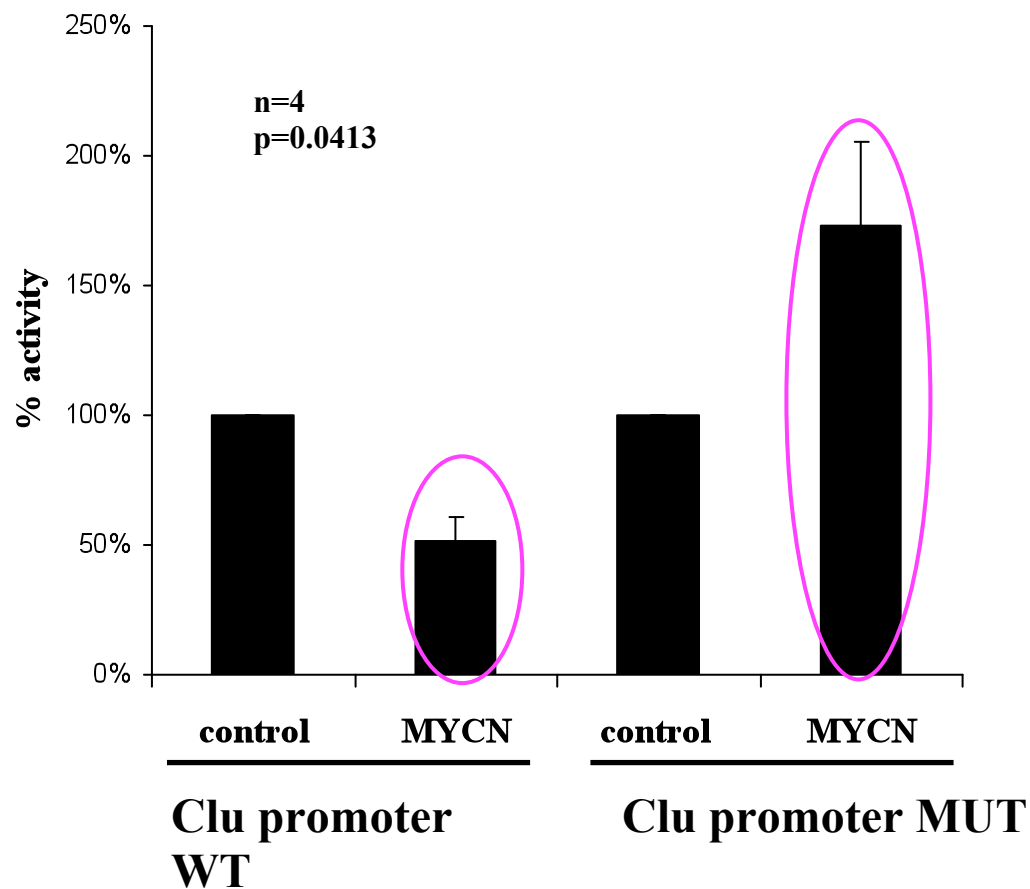


Fig 12 :

Saggio di attivita' luciferasica:

Le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y sono state trasfettate transientemente con un vettore di luciferasi pGL2 Promoter Vector contenente o il promotore della clusterina *wild type* (pGL2-CLU WT) o il promotore della clusterina mutato nella sequenza E-BOX (pGL2-CLU MUT), un vettore di controllo Renilla e un vettore CMV contenente il cDNA MYCN.

A 24h dalla trasfezione e' stata misurata l'attivita' luciferasica nella condizione WT o MUT in presenza o in assenza di MYCN rispetto al controllo di riferimento.

4.LA CLUSTERINA E' SOGGETTA AD ALTERAZIONI EPIGENETICHE CHE NE INIBISCONO L'ESPRESSIONE

Il gene della clusterina e' soggetto a modificazioni epigenetiche e la sua espressione puo' essere modulata dall' istone deacetilasi HDAC e dagli inibitori della DNA metiltrasferasi DNMT (131). La metilazione del DNA consiste nel legame di un gruppo metile (-CH₃) ad una base azotata. Differenti basi azotate possono subire questo tipo di modificazione per diverse funzioni. Nel caso specifico del genoma eucariotico, la metilazione puo' avvenire a livello della citosina del dinucleotide CpG. Il promotore di ApoJ/clusterina e' ricco di isole CpG che possono essere soggette a metilazione determinando cosi' un silenziamento trascrizionale.

Il DNA genomico e' presente nel nucleo cellulare sottoforma di un complesso multiproteico associato a proteine, che prende il nome di cromatina. Il nucleosoma e' l'unita' di strutturazione fondamentale della cromatina ed e' costituito dagli istoni legati al DNA.

L'acetilazione degli istoni e' stata a lungo associata alle regioni, nella cromatina, trascrizionalmente attive (132, 133). Al contrario, la deacetilazione, all'induzione della repressione in molti geni inducibili. L'acetilazione e' una modificazione post-traduzionale reversibile delle code associate al "core" istonico, essa consiste nel trasferimento della porzione acetile dell'acetil-CoA sul gruppo ϵ -NH₃⁺ dei residui conservati di lisina.(134).

La capacita' trasformante dell'oncoproteina MYCN e' in parte causata dalla sua

capacita' di inibire l'espressione di geni soppressori tumorali, attraverso il reclutamento di macromolecole, quali ad esempio metilasi o istone deacetilasi, che agiscono direttamente a livello di specifiche regioni genomiche. L'alterazione delle strutture che riducono o aumentano l'accessibilità alla trascrizione e traduzione dei geni, si configura come un evento epigenetico ,che determina un'alterazione dell' equilibrio cellulare favorendo lo sviluppo di cellule tumorali. La trasformazione del gene Ras, per esempio, e' associata al silenziamento in seguito a metilazione del gene di ApoJ/clusterina (135).

ChiP and Chip bologna

5. TRATTAMENTI CON FARMACI DEMETILANTI E/O DEACETILANTI IN GRADO DI RIPORTARE IL LIVELLO D'ESPRESSIONE DELLA CLUSTERINA A LIVELLI NORMALI

Da studi precedenti e' emerso che la clusterina e' silenziata da modificazioni epigenetiche in cellule tumorali endoteliali (136) e che l'utilizzo di farmaci demetilanti e/o inibitori dell'istone deacetilasi e' in grado di riportare il livello d'espressione della clusterina a livelli normali in diversi tipi di linee cellulari, comprese quelle di neuroblastoma (136). Alla luce di questi risultati, nel nostro laboratorio, si e' ipotizzato che il rimodellamento eseguito dal promotore della clusterina, ad opera di MYCN, e' necessario per il silenziamento della clusterina nel neuroblastoma.

Abbiamo deciso di trattare alcune linee cellulari di neuroblastoma (Kelly e LAN-1) con differenti farmaci epigenetici, quali:

- Tricostatina A (TSA)= farmaco appartenente alla classe degli inibitori dell'istone deacetilasi
- Acido Valproico (VPA)= inibitore dell'enzima istone deacetilasi 1
- 5'-aza-2'-deoxycytidine (AZA)= appartenente alla classe degli agenti demetilanti in grado di inibire DNMT (DNA methyl transferase)

A 24 h dal trattamento l'espressione proteica della clusterina e' stata analizzata mediante saggio di Western Blot. Abbiamo osservato che il livello d'espressione

della clusterina subisce un'incremento sostanziale, specialmente dopo il trattamento con la Tricostatina A e l'Acido Valproico (Fig.13).

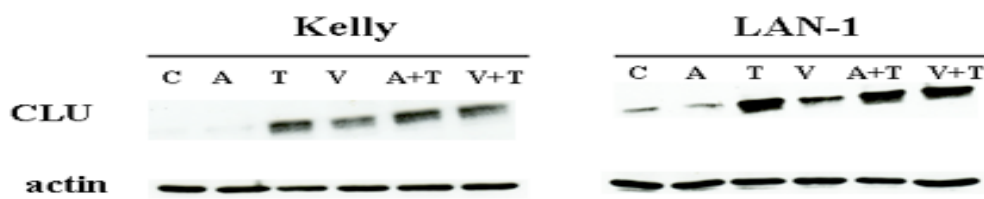


Fig 13:

Saggio di Western Blot:

Cellule LAN-1 e Kelly trattate con Tricostatina A (T), Acido Valrpoico (V), 5'-aza-2'-deoxycytidine (A). I tre farmaci sono stati usati singolarmente o in combinazione. A 24h dal trattamento e' stata analizzata l'espressione della clusterina usando come controllo (C) il campione non trattato.

Correlazione con effetti sul ciclo cellulare ed apoptosi in cellule di neuroblastoma

Alla luce di quanto e' emerso dai risultati precedenti, si e' deciso di trattare la linea cellulare di neuroblastoma LAN-1 con TSA o VPA per 24h e 48h ed analizzare gli effetti di questi due farmaci sulla proliferazione cellulare (Fig. 14) e sul ciclo cellulare (Fig. 15).

Le cellule trattate con i due farmaci mostrano una diminuita proliferazione gia' a 24h dal trattamento se confrontate con il controllo.

Nell'analisi del ciclo cellulare il trattamento epigenetico determina un blocco in G1 con un aumento consistente del numero di cellule in apoptosi (Fig15).

LAN-1

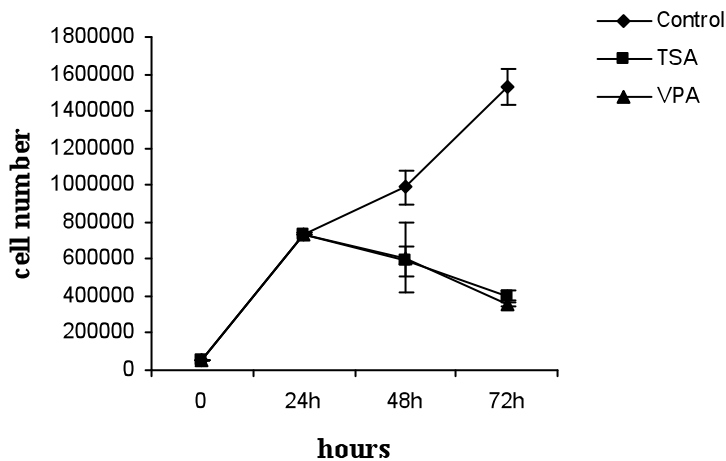


Fig 14:

Saggio di vitalita' cellulare:

Saggio di vitalita' cellulare mediante l'impiego del trypan blu su cellule di neuroblastoma ,LAN-1, trattate a vari tempi con TSA (1uM) e con VPA (1,5 mM).

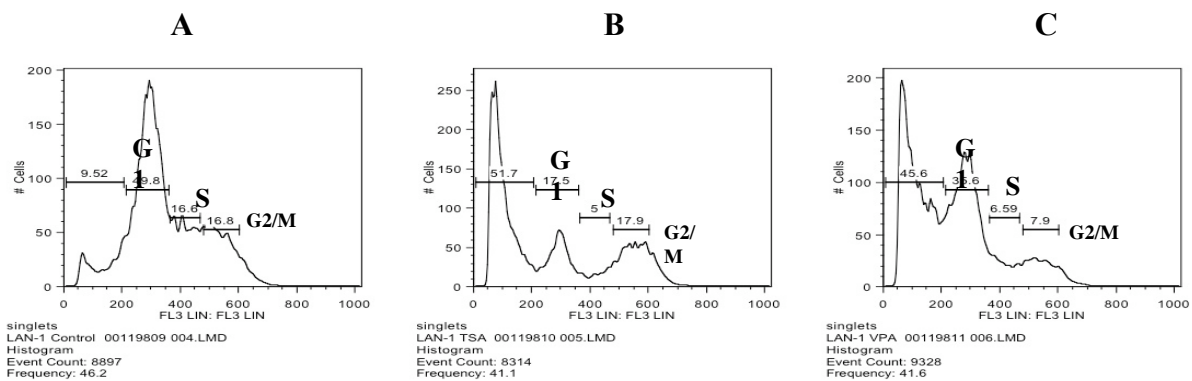


Fig 15:

Analisi al FACS:

Analisi quantitativa del contenuto di DNA nelle varie fasi del ciclo cellulare a 24 h dal trattamento con farmaci epigenetici.

A= LAN-1 wt (linea parentale non trattata)

B= LAN-1 trattate per 24 h con TSA ad una concentrazione di 1uM

C= LAN-1 trattate per 24 h con VPA ad una concentrazione di 1,5 mM

6.L'EFFICACIA DI FARMACI DEACETILANTI (HDAC INHIBITORS) E' DIPENDENTE DALLA RIATTIVAZIONE DELLA CLUSTERINA

Per capire se effettivamente esiste una correlazione tra efficacia dei farmaci deacetilanti e riattivazione della clusterina, si e' deciso di trattare due linee di cloni stabili di neuroblastoma esprimanti un Sh-RNA contro la clusterina sia con la Tricostatina A che con l'Acido Valproico.

A 24 h dal trattamento e' stata analizzata l'espressione proteica della clusterina mediante saggio di Western Blot (Fig.16). Il livello d'espressione della clusterina, nei cloni contenenti il costrutto sh-CLU e' molto piu' basso dei controlli, sia in condizioni normali che indotte .

Inoltre, in termini di proliferazione cellulare (Fig.17), analisi del ciclo cellulare (Fig.18) ed invasivita' cellulare (Fig.20), il silenziamento della clusterina sembra essere correlato con un incremento sia della proliferazione che dell'invasivita' cellulare.

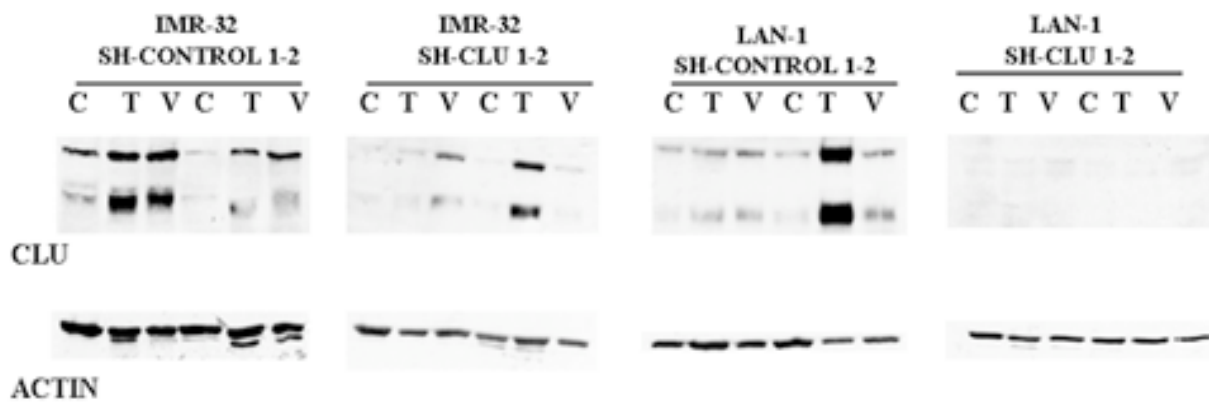


Fig 16:

Saggio di Western Blot:

Cellule IMR-32 e LAN-1 stabilmente trasfettate con un Sh-RNA contro la clusterina (IMR-32 SH CLU 1-2 e LAN-1 SH-CLU 1-2) o stabilmente trasfettate con un Sh-RNA scramble (IMR-32 SH-CONTROL 1-2 e LAN-1 SH-CONTROL 1-2) trattate con Tricostatina A (T) o con Acido Valproico (V). A 24h dal trattamento e' stata analizzata l'espressione della clusterina usando come controllo (C) il campione non trattato.

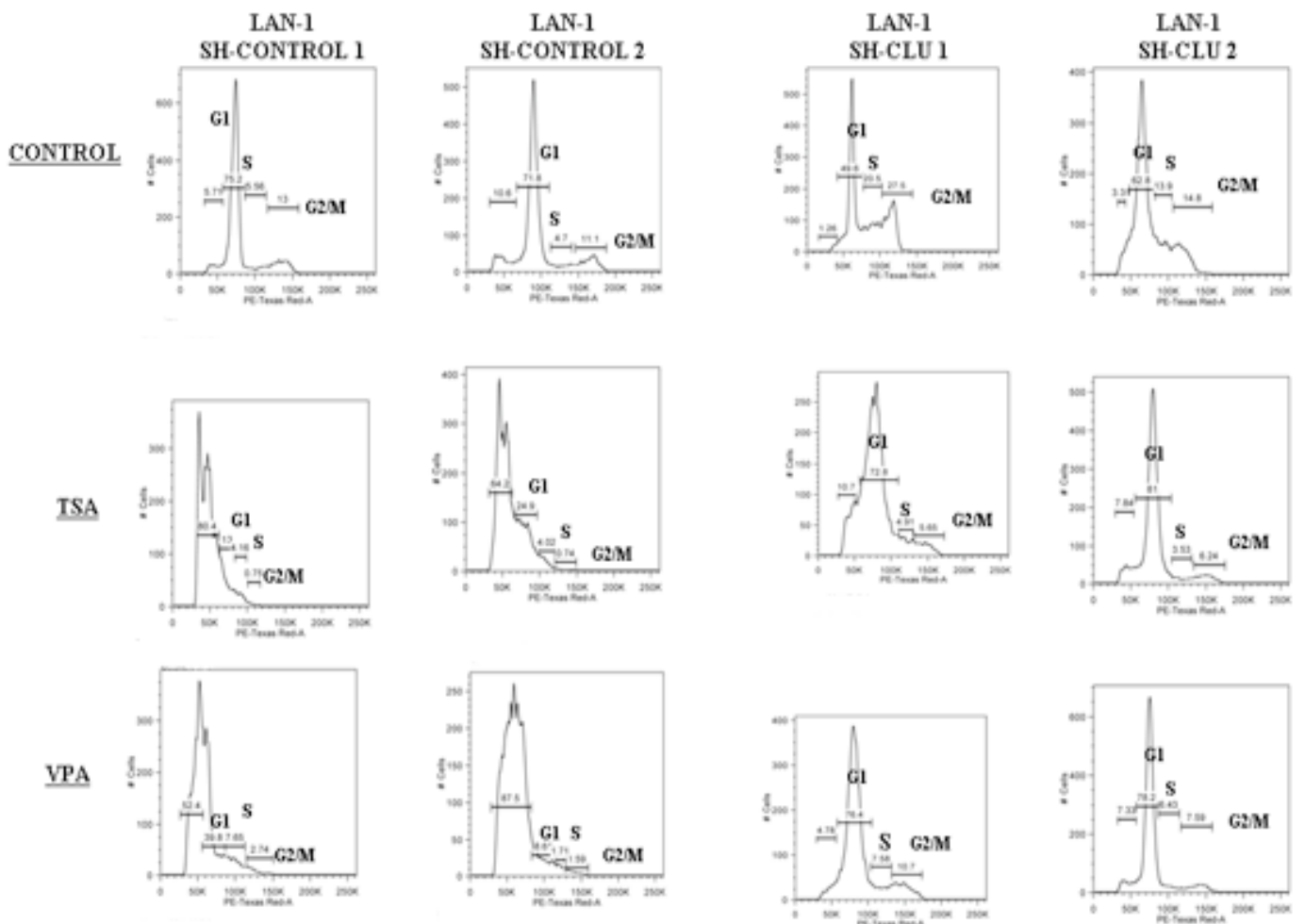


Fig 17:

Analisi al FACS:

Analisi quantitativa del contenuto di DNA nelle varie fasi del ciclo cellulare a 24 h dal trattamento con farmaci epigenetici.

L'analisi è stata eseguita su cloni stabili LAN-1 esprimenti un Sh-RNA contro la clusterina o un Sh-RNA scramble, trattati per 24h con TSA (1uM) e con VPA (1,5 mM).

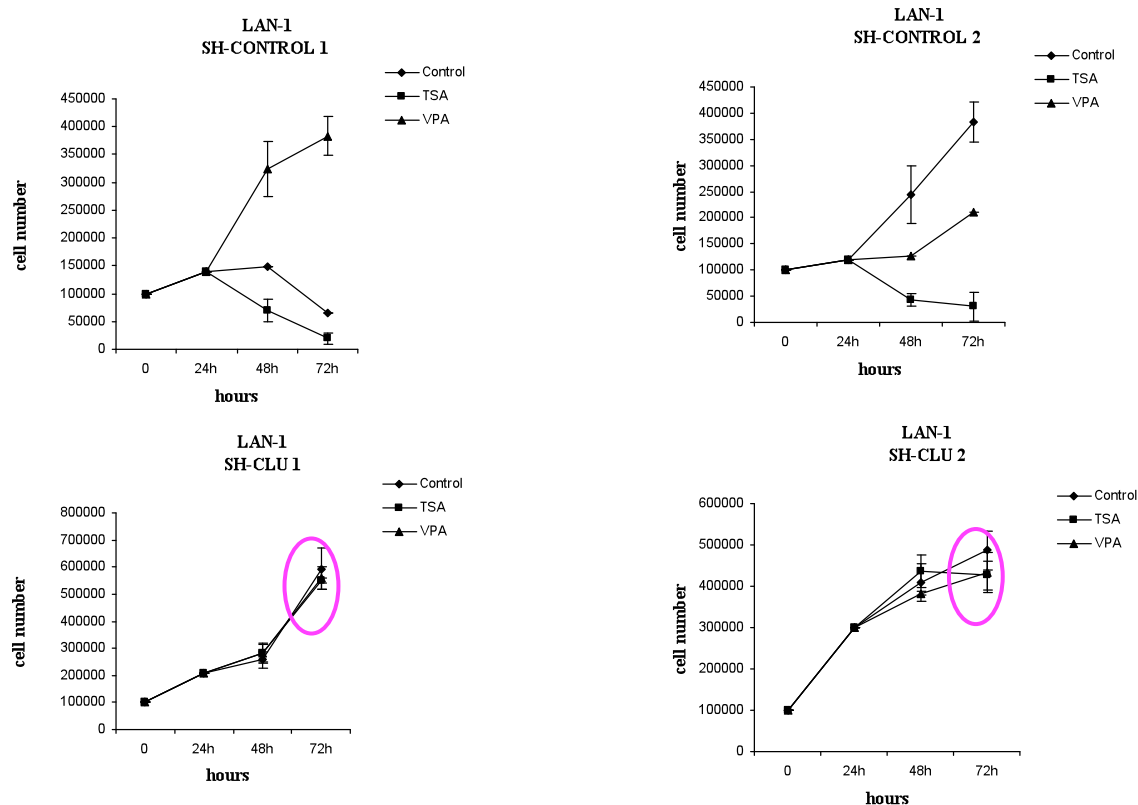


Fig 18:

Saggio di vitalita' cellulare:

Saggio di vitalita' cellulare mediante l'impiego del trypan blu su cloni stabili LAN-1 esprimanti un Sh-RNA contro la clusterina o un Sh-RNA scramble, trattati a vari tempi con TSA (1uM) e con VPA (1,5 mM).

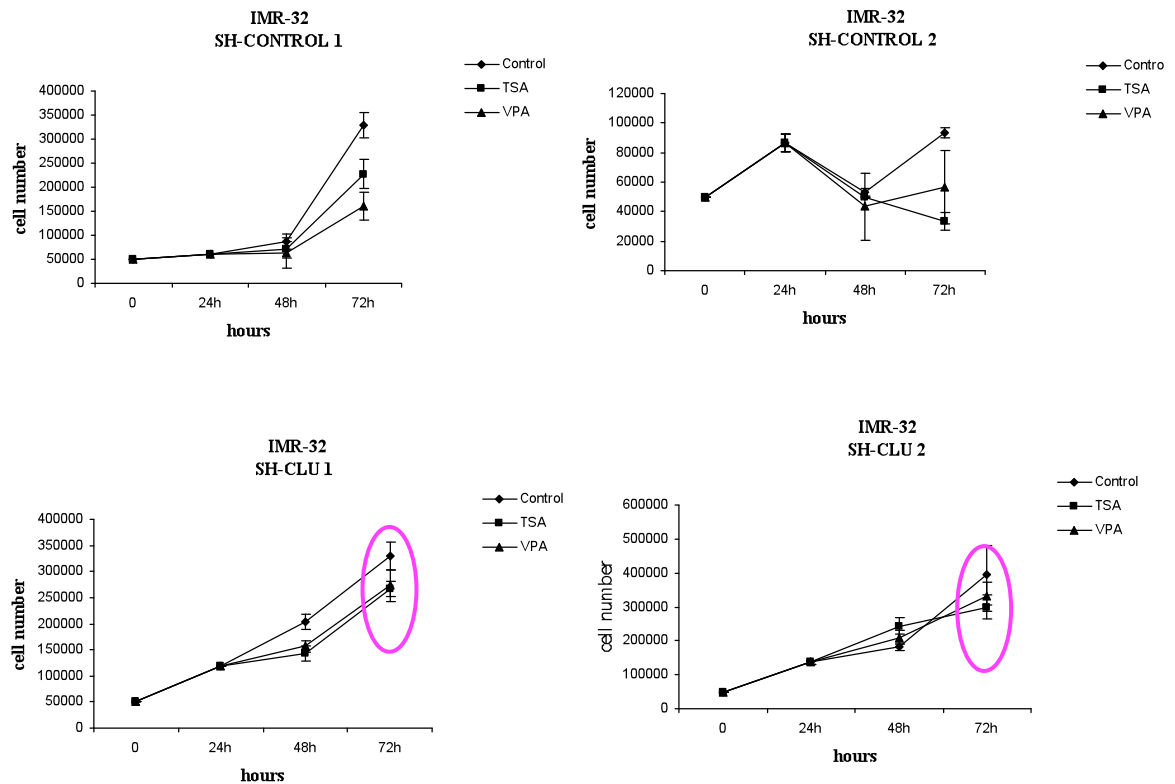


Fig 19:

Saggio di vitalita' cellulare:

Saggio di vitalita' cellulare mediante l'impiego del trypan blu su cloni stabili IMR-32 esprimanti un Sh-RNA contro la clusterina o un Sh-RNA scramble, trattati a vari tempi con TSA (1uM) e con VPA (1,5 mM).

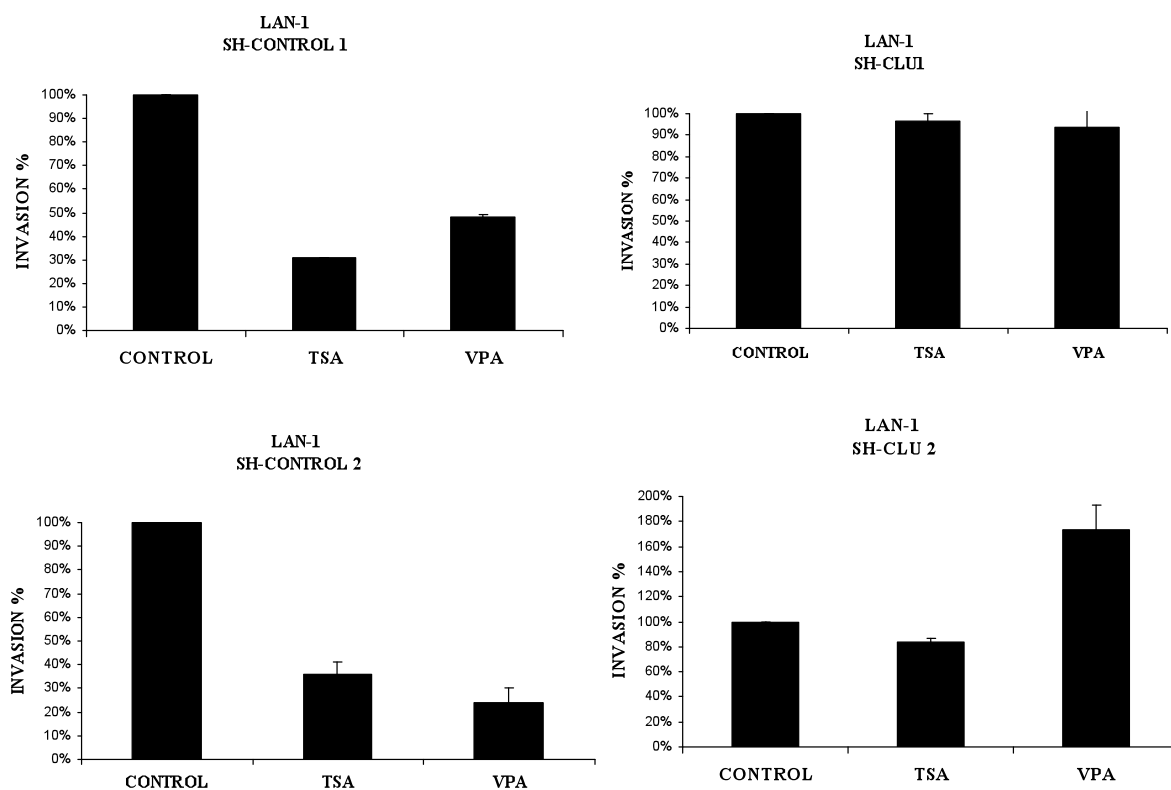


Fig 20:

Saggio di invasivita' cellulare:

Saggio di invasivita' cellulare eseguito su cloni stabili LAN-1 esprimenti un Sh-RNA contro la clusterina o un Sh-RNA scramble, trattati per 24h con TSA (1uM) e con VPA (1,5 mM). I dati sono stati espressi in percentuale di invasivita' attraverso la membrana rispetto al controllo valutato come 100% di invasivita' cellulare.

DISCUSSIONE

In questa tesi sono stati riportati i dati relativi allo studio della relazione tra l'interazione diretta tra MYCN e clusterina e la riduzione nei livelli d'espressione di quest'ultima con consecutivo incremento della proliferazione ed invasività delle cellule tumorali.

Inizialmente e' stato dimostrato che un' acuta overespressione di MYCN e' strettamente correlata con una drastica diminuzione nei livelli d'espressione della clusterina ,sia a livello proteico (Fig.7) che al livello del RNA messaggero (Fig.8). Inoltre MYCN e' in grado di legare le sequenze E-BOX presenti sul promotore della clusterina sia *in vitro* che *in vivo* (Fig. 10-11), facendo supporre che questa diminuzione d'espressione sia legame dipendente e che il blocco avvenga a livello trascrizionale. Il meccanismo d'azione del fattore di trascrizione MYCN prevede una regolazione negativa indiretta dei suoi geni bersaglio, ma in questo caso e' proprio mediante interazione diretta con il promotore, che riesce ad agire negativamente sull'espressione della clusterina (Fig.12).

Questa azione negativa farebbe presupporre un'alterazione della struttura della cromatina, mediante deacetilazione istonica, con consecutiva riduzione dell'accessibilita' alla trascrizione e traduzione dei geni. La cromatina gioca un ruolo attivo nella repressione temporanea e nell'attivazione di specifici geni. La regolazione della trascrizione mediata dalla cromatina coinvolge diversi meccanismi

come il posizionamento dei nucleosomi, il rimodellamento cromatinico e la modificazione post-trascrizionale degli istoni (137).

Dai nostri dati ottenuti *in vivo* (Fig. 11B) emerge un'incremento nei livelli di acetilazione degli istoni H3 e H4 là dove MYCN è espresso e legato alle sequenze E-BOX presenti sul promotore della clusterina. L'acetilazione istonica, caratterizzata da una modificazione post-traduzionale reversibile delle code associate al "core" istonico, è associata alle regioni, nella cromatina, trascrizionalmente attive (138, 139). Si ritiene che la neutralizzazione delle cariche positive della lisina tramite l'acetilazione riduca l'interazione delle code del "core" istonico con il DNA. I dati da noi ottenuti sono quindi in netto disaccordo con quanto riportato in letteratura. L'oncoproteina MYCN, nel nostro caso, regola negativamente l'espressione della clusterina mediante legame diretto sul promotore e mediante il reclutamento di istoni deacetilasi (HDAC) ,che agiscono direttamente a livello istonico riducendo l'accessibilità alla trascrizione e traduzione del gene bersaglio. Questo evento epigenetico determina un'alterazione dell' equilibrio cellulare favorendo lo sviluppo di cellule tumorali.

Studi recenti hanno evidenziato, come ad oggi, l'impiego di sostanze epigenetiche sia alla base della ricerca per sconfiggere il cancro. Lo sviluppo di cellule tumorali e la loro progressione sembra essere determinata da uno squilibrio che origina sia da irregolarità genetiche che irregolarità epigenetiche.

L'impiego, *in vitro*, di farmaci epigenetici demetilanti (in grado di inibire DNMT) e/o inibitori dell'istone deacetilasi (inibitori delle HDAC) ,si è rivelato

fondamentale per riportare il livello d'espressione della clusterina a livelli normali in diversi tipi di linee cellulari di neuroblastoma (Fig.13).

L'impiego di questi farmaci, inoltre, è responsabile di un rallentamento sia nella proliferazione cellulare (Fig.14) che nella progressione del ciclo cellulare con arresto finale in fase G1 e aumento consistente del numero di cellule in apoptosi (Fig.15).

Dai nostri studi è emerso che il rallentamento della proliferazione cellulare e l'arresto del ciclo cellulare in G1 è associato ad un progressivo riaccumulo di clusterina. I farmaci epigenetici utilizzati non sembrano essere efficaci se non associati alla riattivazione della clusterina stessa (Fig. 17-19).

Dai risultati ottenuti in questo studio, si può concludere che il silenziamento della clusterina, determinato dalla overespressione dell'oncoproteina MYCN, comporta un'incremento della proliferazione ed invasività cellulare (Fig.20) in neuroblastoma.

Questo porta a classificare la clusterina come nuovo soppressore tumorale nel neuroblastoma in quanto, promuovendo il processo apoptotico, contrasta l'avanzamento e proliferazione delle cellule tumorali.

BIBLIOGRAFIA

1. Brodeur GM. Molecular pathology of human neuroblastomas. *Semin Diagn Pathol.* 1994;11:118-25
2. Brodeur G.M. Neuroblastoma :biological insights into a clinical Enigma.*Nat Rev Cancer* 2003 Mar;3(3):203-16
3. Bowman LC, Castleberry RP, Cantor A, Joshi V, Cohn SL, Smith EI, Yu A, Brodeur GM, Hayes FA, Look AT. Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Mar 5;89(5):373-80
4. Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1997 Aug;33(9):1430-7; discussion 1437-8. Review
5. Adams GA, Shochat SJ, Smith EI, Shuster JJ, Joshi VV, Altshuler G, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams N, Castleberry RP. Thoracic neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study *J Pediatr Surg.* 1993 Mar;28(3):372-7
6. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993 Aug;11(8):1466-77. Review
7. Johnson KJ, Puumala SE, Soler JT, Spector LG. Perinatal characteristics and risk of neuroblastoma. *Int J Cancer.* 2008 Sep 1;123(5):1166-72.

8. Castel V, García-Miguel P, Cañete A, Melero C, Navajas A, Ruíz-Jiménez JI, Navarro S, Badal MD. Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS) and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting. *Eur J Cancer*. 1999 Apr;35(4):606-11.
9. Haase GM, Atkinson JB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. Surgical management and outcome of locoregional neuroblastoma: comparison of the Childrens Cancer Group and the international staging systems. *J Pediatr Surg*. 1995 Feb;30(2):289-94.
10. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007 Jun 23;369 (9579):2106-20.
11. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer*. 1971 Feb;27(2):374-8.
12. H. Shimada, J. Chatten, W.A. Newton Jr., N. Sachs, A.B. Hamoudi, T. Chiba, H.B. Marsden and K. Misugi, Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas, *J Natl Cancer Inst* 73 1984, pp. 405–416
13. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*. 1983 Dec;35(2 Pt 1):359–367.
14. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent J. Amplified DNA with limited homology to myc

cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 305(5931):245–248.

15. Kohl NE, Gee CE, Alt FW. Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science*. 1984 Dec 14;226(4680):1335–1337.

16. Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M., Varmus H.E. and Bishop J.M. Amplification of N-Myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science*, 1984; 224, 1121-1124

17. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001 Nov 1;92(9):2451-61.

18. Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001 Nov 15;92(10):2699-708.

19. White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, Winter C, Gregory SG, Hogarty MD, Maris JM, Brodeur GM. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene*. 2005 Apr 14;24(16):2684-94

20. Schwab M. MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett*. 2004 Feb 20;204(2):179-87. Review

21. Wenzel A, Schwab M. The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review. *Eur J Cancer*. 1995;31A(4):516-9.
22. John M. Maris, Katherine K. Matthay, Molecular Biology of Neuroblastoma, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 17, Issue 7 (July), 1999: 2264).
23. Quéva C, Hurlin PJ, Foley KP, Eisenman RN. Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1998;63:423-33. Review.
24. Hackett CS, Hodgson JG, Law ME, Fridlyand J, Osoegawa K, de Jong PJ, Nowak NJ, Pinkel D, Albertson DG, Jain A, Jenkins R, Gray JW, Weiss WA. Genome-wide array CGH analysis of murine neuroblastoma reveals distinct genomic aberrations which parallel those in human tumors. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5266-73.
25. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1997 Jun 2;16(11):2985-95.
26. Burkhart CA, Cheng AJ, Madafiglio J, Kavallaris M, Mili M, Marshall GM, Weiss WA, Khachigian LM, Norris MD, Haber M. Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Sep 17;95(18):1394-403.
27. Lutz W, Stöhr M, Schürmann J, Wenzel A, Löhr A, Schwab M. Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-

prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene*. 1996 Aug 15;13(4):803-12.

28. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408:307-10.

29. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

30. Lane DP. Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-6.

31. Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, Lunec J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2003 Jul 18;197(1-2):93-8.

32. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, Triche TJ, Reynolds CP. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6185-93.

33. Slack A, Chen Z, Tonelli R, Pule M, Hunt L, Pession A, Shohet JM. The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18;102(3):731-6. Epub 2005 Jan 11

34. Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Viré E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F. Myc represses transcription through recruitment of DNA

methyltransferase corepressor. *EMBO J*. 2005 Jan 26;24(2):336-46. Epub 2004 Dec 16.

35. Kleine-Kohlbrecher D, Adhikary S, Eilers M. Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;302:51-62. Review.

36. Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M, Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettner R, Schramm A, Christiansen H, Eilers M, Eggert A, Berwanger B. MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2008 Feb 1;122(3):699-704.

37. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. Review.

38. Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M, Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettner R, Schramm A, Christiansen H, Eilers M, Eggert A, Berwanger B. MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2008 Feb 1;122(3):699-704.

39. Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, Knoepfler PS. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9654-62.

40. Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. Myc influences global chromatin structure. *EMBO J*. 2006 Jun 21;25(12):2723-34. Epub 2006 May 25.

41. Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):764-70. Epub 2006 Jun 11.
42. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074-80. Review.
43. Staynov DZ. The controversial 30 nm chromatin fibre. *Bioessays.* 2008 Oct;30(10):1003-9.
44. Reisman D, Glaros S, Thompson EA., The SWI/SNF complex and cancer., *Oncogene.* 2009 Apr 9;28(14):1653-68. Epub 2009 Feb 23.
45. Ko M, Sohn DH, Chung H, Seong RH. Chromatin remodeling, development and disease. *Mutat Res.* 2008 Dec 1;647(1-2):59-67. Epub 2008 Aug 20. Review.
46. McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol.* 2000 Jan;20(2):556-62.
47. Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep.* 2003 Jun;4(6):575-80.
48. Steve E. Jones, Catherine Jomary. Molecules in focus: Clusterin. *J of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002) 427-431 44.

49. Tschopp J, French LE, Clusterin; modulation of competent function, *Clin Exp Immunol*. 1994 Aug;97 Suppl 2:11-4. Review;
50. Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995 Jul;27(7):633-45.
51. Jones SE, Jomary C. Clusterin., *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 May;34(5):427-31.
52. Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease, *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 15;50(4):305-15.
53. Montpetit M.L., Lawless K.R., Tenniswood M. (1986) Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate. *Prostate* 8:25-36.
54. H.V. de Silva, J.A.K. Harmony, W.D. Stuart, C.M. Gil, J. Robbins: Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* 29:5380–89, 1990.
55. L. Kirschbaum, J.A. Sharpe, B. Murphy, A.J.F. d'Apice, B. Classon, P. Hudson, ID. Walker: Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. *EMBO J*. 8: 711-18, 1989.
56. D.E. Jenne, J. Tschopp: Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolytic found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7123–27, 1989.

57. Wong P., Taillefer D., Lakins J., Pineault J., Chader G. and Tenniswood M.: Molecular characterization of human TRPM2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 221:917–25, 1994.
58. Wong P., Taillefer D., Lakins J., Pineault J., Chader G. and Tenniswood M.: Molecular characterization of human TRPM2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 221:917–25, 1994.
59. Wong P., Pineault J.M., Lakins J., Taillefer D., Le'ger J.G., Wang C. and Tenniswood M.: Genomic organization and expression of TRPM-2 (clusterin), a gene implicated in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 268:5021–31, 1993.
60. Rowling P.J.E., Freedman R.E.: Folding, assembly, and posttranslational modification of proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Subcell. Biochem.* 21:41–80, 1993.
61. Kapron J.T., Hilliard G.M., Lakins J.N., Tenniswood M.P., West K.A., Carr S.A., Crabb J.W.: Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin. *Protein Sci.* 6:2120–33, 1997.
62. Choi-Miura N.H., Takahashi Y., Nakano Y., Tobe T., Tomita M.: Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). *J. Biochem.* 112:557–61, 1992.
63. Leskov, K., Klovov, D.Y., Li J., Kinsella, T., Boothman, D.A.: Synthesis and functional analysis of nuclear clusterin: a cell death protein. *J Biol Chem* 278:11590–600, 2003.

64. Maurizio Scaltriti, Anna Santamaria, Rosanna Paciucci, and Saverio Bettuzzi. Intracellular Clusterin Induces G2-M Phase Arrest and Cell Death in PC-3 Prostate Cancer Cell. *Cancer Research* 64, 2004.
65. R.W. Bailey, A.K. Dunker, C.J. Brown, E.C. Garner, M.D. Griswold: Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry* 40:11828–40, 2001.
66. B. H. Han, R. B. DeMattos, L. L. Dugan, J. S. Kim-Han, R. P. Brendza, J. D. Fryer, M. Kierson, J. Cirrito, K. Quick, J. A. K. Harmony, B. J. Aronow, D. M. Holtzman, Clusterin contributes to caspase-3 independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia, *Nat. Med* 7 (3) (2001) 338-343.
67. Poon, S., Treweek, T.M., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B., Carer, J.A.: Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett.* 513:259-66, 2003.
68. Lakins, J.N., Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Tenniswood, M.P., Wilson, M.R.: Evidence that clusterin has discrete chaperone and ligand binding sites. *Biochemistry* 41:282-91, 2002.
69. Cunha G.R., Hayward S.W., Dahiya R., Foster B.A.: Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat. (Basel)* 155:63-72, 1996.
70. M.M. Bartl, T. Luckenbach, O. Bergner, O. Ullrich, C. Koch-Brandt: Multiple receptors mediate ApoJ-dependent clearance of cellular debris into non-professional phagocytes. *Exp. Cell Res.* 271(1):130–41, 2001.

71. B.J. Aronow, S.D. Lund, T.L. Brown, J.A.K. Harmony, D.P. Witte: Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:725–9, 1993.
72. Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, Kinsella TJ, Boothman DA. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):5907-12.
73. Miyake H., Nelson C., Rennie P.S., Gleave M.E.: Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Res.* 60:170-76, 2000.
74. Zellweger T., Chi K., Miyake H. et al (2002) Enhanced radiosensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clin Cancer Res* 8:3276-3284.
75. Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2547-54.
76. Zellweger T, Kiyama S, Chi K, Miyake H, Adomat H, Skov K, Gleave ME. Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumour model. *BJU Int.* 2003 Sep;92(4):463-9.

- 77.Miyake H, Hara I, Gleave ME. Antisense oligodeoxynucleotide therapy targeting clusterin gene for prostate cancer: Vancouver experience from discovery to clinic. *Int J Urol*. 2005 Sep;12(9):785-94.
78. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene*. 2004 Mar 25;23(13):2298-304.
- 79.Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M, Corti A.: Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene* 21:4328-34, 2002.
- 80.Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Corti A, Corvetta D, Sala A, Bettuzzi S. Ca²⁺ depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells. *Cell Death Differ*. 2005 Jan;12(1):101-4.
- 81.Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Scorcioni F, Astancolle S, Mangiola M, Bettuzzi S, 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*. 2004 Aug 15;382(Pt 1):157-68.
- 82.Chi KN, Zoubeidi A, Gleave ME. Custirsen (OGX-011): a second-generation antisense inhibitor of clusterin for the treatment of cancer *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Dec;17(12):1955-62.).
- 83.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. Myc-

transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo. *Cancer Res.* 2004 May 1;64(9):3126-36.

84. Miyake H., Hara I., Kamidono S. et al (2001) Synergetic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligonucleotides targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res* 7:4245-4252.

85. Bettuzzi S., Scorcioni F., Astancolle S. et al (2002) Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene* 21:4328-4334.

86. Van Weelden K., Flanagan L., Binderup L. et al (1998) Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D3 analogue, EB1089. *Endocrinology* 139:2102-2110.

87. Hara I., Miyake H., Gleave M.E. et al (2001) Introduction of clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their resistance to cytotoxic chemotherapy through inhibition of apoptosis both *in vitro* and *in vivo*. *Jpn J Cancer Res* 92:1220-1224.

88. Shannan B, Seifert M, Boothman DA, Tilgen W, Reichrath J. (2006) Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control. *J Mol Histol.* 37(5-7):183-8.

89. Koch-Brandt, C. and Morgans, C. (1996) Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis? *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 16, 130-149.

90. Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P. S. and Gleave, M. E. (2001) Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer res.* 60, 2547-2554.
91. Miyake, H., Gleave, M. E., Arakawa, S., Kamidono, S. and Hara, I. (2002) Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential. *J. Urol.* 167, 2203-2208.
92. Han B.H., DeMattos R.B., Dugan L.L., Kim-Han J.S., Brendza R.P., Fryer J.D., Kierson M., Cirrito J., Quick K., Harmony J.A.K., Aronow B.J., Holtzman D.M.: Clusterin contributes to caspase-3 independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nature Med.* 7:338-43, 2003.
93. Yang, C. R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J. and Boothmann, D. A. (2000) Nuclear clusterin/XIP8, an X-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5907-5912.
94. Bettuzzi, S., Troiano, L., Davalli, P., tropea, F., Ingletti, M. C., Grassilli, E., Monti, D., Corti, A., and Franceschi, C. (1991) *In vivo* accumulation of sulfated glycoprotein 2 mRNA in rat Thymocytes upon dexamethasone-induced cell death. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 175, 810-175.
95. Leskov, K. S., Criswell, T., Antonio, S., Li, J., Yang, C. R., Kinsella, T. J. and Boothman, D. A. (2001) When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair. *Semin. Radiat. Oncol.* 11, 352-372.
96. P. Wong, D. Taillefer, J. Lakins, J. Pineault, G. Chader, M. Tenniswood, Molecular characterization of human TRPM-2/Clusterin, a gene associated with

sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration, *Eur. J. Biochem.* 221 (1994) 917-925.

97. Y. Herault, G. Chatelain, G. Brun, D. Michel, V-src-induced-transcription of the avian Clusterin gene, *Nucl. Acid Res.* 20 81992) 6377-6383.

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

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

100. G. Jin, P. H. Howe, Regulation of Clusterin gene expression by transforming growth factor β , *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 26620-26626.

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

102. Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res.* 2006 Dec;40(12):1324-34. Review.

103. Klovov D, Criswell T, Leskov KS, Araki S, Mayo L, Boothman DA. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat Res.* 2004 Dec 2;568(1):97-110.

104. Sallman DA, Chen X, Zhong B, Gilvary DL, Zhou J, Wei S, Djeu JY. Clusterin mediates TRAIL resistance in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Nov;6(11):2938-47.
105. Trougakos IP, Djeu JY, Gonos ES, Boothman DA. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res.* 2009 Jan 15;69(2):403-6.
106. Han BH, DeMattos RB, Dugan LL, Kim-Han JS, Brendza RP, Fryer JD, Kierson M, Cirrito J, Quick K, Harmony JA, Aronow BJ, Holtzman DM. Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat Med.* 2001 Mar;7(3):338-43.
107. 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. Apolipoprotein J/clusterin induction in myocarditis: A localized response gene to myocardial injury. *Am J Pathol.* 1996 Jun;148(6):1971-83.
108. Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 May;34(5):427-31. Review.
109. Miyake, H., Gleave, M., Kamidono, S., Hara, I.: Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. *Urology* 59:150-4, 2002.
110. Hough, C.D., Cho, K.R., Zonderman, A.B., Schwartz, D.R., Morin, P.J.: Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res.* 61:3869-76, 2001.

111. Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Carani, C., Madeo, B., Tampieri, A., Corti, A.: Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulphated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 60:28-34, 2000.
112. Zhang L.Y., Ying W.T., Mao Y.S., He H.Z., Liu Y., Wang H.X., Liu F., Wang K., Zhang D.C., Wang Y., Wu M., Qian X.H., Zhao X.H.: Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J.Gastroenterol.* 9:650-4, 2003.
113. Behrens, P., Jeske, W., Wernet, N., Wellman, A.: Downregulation of clusterin expression in testicular germ cell tumor. *Pathobiology* 69:19-23, 2001.
114. Rizzi F, Caccamo AE, Belloni L, Bettuzzi S., Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells.,2009 May;219(2):314-23.
115. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene.* 2004 Mar 25;23(13):2298-304.
116. Santilli G, Aronow BJ, Sala A.(2003)Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity.*J Biol Chem.*;278(40):38214-9.
117. Cortés Sempere M, Rodríguez Fanjul V, Sánchez Pérez I, Perona R, The role of the NFkappaB signalling pathway in cancer,*Clin Transl Oncol.* 2008 Mar;10(3):143-7.

118. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS, NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy, *Biofactors*. 2007;29(1):19-35)
119. Kieran M., Blank V., Logeat F., Vandekerckhove J., Lottspeich F., Le Bail O., Urban M. B., Kourilsky P., Baeuerle P.A., and Israel A. (1990) The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the real oncogene product. *Cell* 62:1007-1018
120. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 2002 Jun;16 (6):1053-68. Review.
121. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002 Apr; 109 Suppl: S81-96. Review.
122. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:621-63. Review.
123. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998 Sep 11; 281(5383):1680-3.

124. Thomas SK, Messam CA, Spengler BA, Biedler JL, Ross RA (2004) Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 279(27):27994-9.
125. Chayka O., Corvetta D., Dew M., Caccamo A.E., Piotrowska I., Santilli G., Gibson S., Sebire N.J., Himoudi N., Anderson J., Bettuzzi S., Thomas-Tikhonenko A. and Sala A. ApoJ/clusterin is a haploinsufficient neuroblastoma suppressor gene negatively regulated by the MYCN-induced miR 17-92 microRNA cluster. *J Natl Cancer Institute.* 2009 May 6;101(9):663-77. Epub 2009 Apr 28.
126. John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
127. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.
128. Schulte, J.H., Horn, S., Otto, T., Samans, B., Heukamp, L.C., Eilers, U.C., Krause, M., Astrahantseff, K., Klein-Hitpass, L., Buettner, R., *et al.* (2008). MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer* 122, 699-704.

129. Caretti G, Salsi V, Vecchi C, Imbriano C, Mantovani R.(2003)Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters.*J Biol Chem.* 278(33):30435-40
130. Solomon MJ, Larsen PL, Varshavsky A.(1988) Mapping protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene.*Cell.*;53(6):937-47.
131. Egger G.et al (2004) Epigenetics in human disease and prospect for epigenetic therapy. *Nature* 429,457.
132. Mizzen C.A., Allis C.D. (1998)Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.*;54(1):6-20.
133. Mitsuyoshi Nakao (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278:25-31.
134. James G. Herman, Jeremy R. Graff, Sanna Myohanen, Barry D. Nelkin, and Stephen B. Baylin (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assays for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* Vol93,9821-9826.

135. Lund P., Weisshaupt K., Mikeska T., Jammias D., Chen X., Kuban R-J., Ungethum U., Krapfenbauer U., Herzel H-P., Schafer R., Walter J. and Sers C. (2006) Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 25,4890-4903.
136. 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.* 1;357(2):39.
137. Kornberg RD, Lorch Y. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Apr;9(2):148-51. Review.
138. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997 Sep 25;389(6649):349-52. Review.
139. Mizzen CA, Allis CD. Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Jan;54(1):6-20. Review.



***GRAZIE A TUTTI!!!
THANKS TO EVERYONE!!!***