



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

Corso di Dottorato di Ricerca in

Genetica e Biologia Cellulare- XXVII Ciclo

“IDENTIFICAZIONE E VALIDAZIONE DELLA PROTEINA

CSB COME ONCOGENE”

s.s.d. BIO/18

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Manuela Caputo

Coordinatore del corso

Prof. Giorgio Prantera

Tutore

Dott. Luca Proietti De Santis

INDICE

1. RIASSUNTO	3
2. SCOPO DELLA TESI	5
3. INTRODUZIONE	6
3.1 Informazioni generali della proteina CSB	10
3.2 CSB: ruolo nel meccanismo di riparazione del DNA	12
3.3 CSB modula negativamente l'attività dell'oncosoppressore p53	19
3.4 CSB: ruolo nell'angiogenesi e nell'adattamento a condizioni di ipossia	24
3.5 La proteina CSB è un fattore essenziale per il differenziamento neuronale e la neuritogenesi	30
4. RISULTATI	34
4.1 La proteina CSB è sovraespressa nelle cellule tumorali	34
4.2 Inibizione della proteina CSB mediante oligonucleotidi antisenso	39
4.3 La down-regolazione di CSB riduce la vitalità e la proliferazione delle cellule tumorali	42
4.4 Analisi di microarray	49
4.5 Silenziamento stabile della proteina CSB mediante <i>short harpin</i>	68
4.6 Saggio di proliferazione effettuato con induttori dell'ER stress	69
5. DISCUSSIONE	70
6. CONCLUSIONI	78
7. MATERIALI E METODI	80
8. BIBLIOGRAFIA	96

1. RIASSUNTO

La proteina Cockayne Syndrome group B (CSB) è una ATPasi, appartenente alla famiglia SWI2/SNF, che lega il DNA e rimodella la cromatina. Mutazioni nel gene *csb* danno origine alla Sindrome di Cockayne (CS), una malattia autosomica recessiva caratterizzata da invecchiamento precoce che ha effetti sulla crescita, lo sviluppo ed il mantenimento di una vasta gamma di tessuti ed organi. Nel contesto del metabolismo cellulare, CSB svolge molteplici funzioni: la proteina partecipa al meccanismo di riparazione del DNA associato alla trascrizione (TCR), gioca un ruolo durante la trascrizione del DNA e regola negativamente l'attività dell'oncosoppressore p53.

In questo lavoro abbiamo dimostrato che differenti tessuti e linee cellulari tumorali mostrano un notevole aumento dell'espressione della proteina CSB. Inoltre, abbiamo provato che la down-regolazione transiente di questa proteina, mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense, causa effetti devastanti nelle cellule tumorali, che la sovraesprimono; in particolare, abbiamo osservato una drastica riduzione dei livelli di proliferazione e di vitalità cellulare, oltre che una induzione di morte per apoptosi.

Inoltre, abbiamo dimostrato che la down-regolazione di questa proteina non ha alcun effetto sulla proliferazione, vitalità ed induzione dell'apoptosi nelle cellule sane.

In aggiunta, la down-regolazione di CSB rende le cellule tumorali più sensibili ad una varietà di farmaci chemioterapici di tipo tradizionale, quali Oxaliplatino, Mitomicina-C e 5-Fluorouracile. Infatti, dopo il trattamento combinato (oligonucleotidi antisense per silenziare CSB + farmaco chemioterapico), le cellule tumorali mostrano un maggior effetto di riduzione della vitalità cellulare ed induzione del processo apoptotico rispetto alle cellule trattate con il solo chemioterapico, con il vantaggio di poter ridurre la dose di chemioterapico somministrato e quindi la tossicità ad esso associata.

Alla luce di questi dati abbiamo supposto che CSB possa funzionare come un vero e proprio oncogene all'interno delle cellule neoplastiche che sono spinte ad up-regolarla per la loro sopravvivenza.

Riteniamo, perciò, che CSB rappresenti un *target* strategico per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali note con il nome di *targeted therapy*. Si tratta di terapie che prevedono l'utilizzo di farmaci definiti "intelligenti" la cui caratteristica fondamentale è la loro straordinaria selettività d'azione in quanto agiscono in maniera selettiva solo su proteine sovraesprese o specifiche delle cellule tumorali.

Nella seconda parte di questa tesi di dottorato abbiamo svolto degli esperimenti per comprendere il ruolo che CSB svolge nel promuovere il fenotipo tumorale e il meccanismo che sottostà all'induzione del processo apoptotico in seguito al suo silenziamento; nello specifico abbiamo cercato di comprendere in quali *pathway* CSB esplica la sua funzione oncogenica e quali meccanismi molecolari sono attivati o repressi in seguito al suo silenziamento. Per fare questo ci siamo avvalsi della tecnologia dei microarray.

Questa analisi ha evidenziato la presenza di una modificazione del profilo trascrizionale indotto dal silenziamento di CSB in cellule HeLa. Nello specifico abbiamo scoperto che la riduzione di CSB, in queste cellule, determina sia una sovraespressione di geni che sono indotti in seguito alla presenza di *stress* del Reticolo Endoplasmatico (ER *stress*) e di diversi geni apoptotici, sia la down-regolazione di geni tra i quali quelli codificanti per vari chaperoni molecolari. Questo scenario suggerisce che nelle cellule HeLa silenziate per CSB, un persistente ER *stress*, induce il processo apoptotico anziché una risposta adattativa. Abbiamo, infine, creato una linea cellulare silenziata in maniera stabile per CSB (HeLa shCSB) per effettuare degli studi mediante l'utilizzo di molecole in grado di indurre l'ER *stress*; questo al fine di valutare se l'assenza di CSB rendesse le cellule HeLa più sensibili al trattamento con tali sostanze.

Tutti questi studi sono volti a capire quale sia effettivamente il ruolo che CSB svolge all'interno delle cellule tumorali, ponendo l'attenzione sull'azione protettiva che questa proteina ha sulla loro vitalità e sopravvivenza.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di validare il ruolo della proteina CSB come oncogene e comprendere i meccanismi che si trovano alla base dell'induzione della morte delle cellule tumorali in seguito al silenziamento di questa proteina.

Nostri studi recenti hanno suggerito che CSB possa avere un ruolo fondamentale per la progressione tumorale. Nello specifico, abbiamo dimostrato che diverse cellule e tessuti tumorali sovraesprimono CSB e che il silenziamento transiente di questa proteina determina l'arresto della proliferazione cellulare, una drastica riduzione dei livelli di vitalità e una massiccia induzione di morte nelle cellule tumorali che la sovraesprimono.

Inoltre, abbiamo valutato l'efficacia della soppressione della proteina CSB nel potenziare l'azione di alcuni farmaci chemioterapici, per verificare se il silenziamento di questa proteina fosse in grado di rendere più sensibili le cellule tumorali al trattamento con questi farmaci. Ad oggi, infatti, l'uso combinato di più farmaci è una modalità di trattamento che ha portato ad un importante incremento nell'efficacia della terapia antitumorale, riducendo la possibilità di sviluppo di casi di resistenza ai farmaci.

Infine, con questa tesi ci siamo posti l'obiettivo di comprendere in quali *pathaway* CSB esplica la sua funzione oncogenica e di capire quali meccanismi molecolari sono attivati o repressi in seguito al suo silenziamento. Abbiamo effettuato un'analisi di microarray volta a identificare i geni "differenzialmente espressi" in cellule HeLa, silenziate in maniera transiente per CSB, rispetto ai controlli (cellule HeLa non trattate, cellule HeLa trattate con solo trasfettante e cellule HeLa trattate con l'oligonucleotide senso che non bersaglia nessun mRNA); questo al fine di comprendere sia il ruolo che CSB svolge, quando è up-regolata nelle cellule neoplastiche, sia il meccanismo molecolare che porta alla morte delle cellule tumorali in assenza di questa proteina.

3. INTRODUZIONE

La vita di ogni singola cellula è strettamente regolata da circuiti che governano la sua proliferazione, omeostasi, senescenza e morte; le cellule cancerose acquisiscono dei difetti a livello di questi circuiti che permettono loro di sfuggire a questa regolazione e di proliferare senza alcuna limitazione¹. Il cancro nelle società industrializzate è oggi la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari; è quindi estremamente importante comprendere le basi molecolari attraverso le quali le cellule cancerose acquisiscono queste capacità proliferative, affinché si possano produrre farmaci antitumorali che colpiscano con elevata specificità solo questa categoria di cellule² (Figura 1).

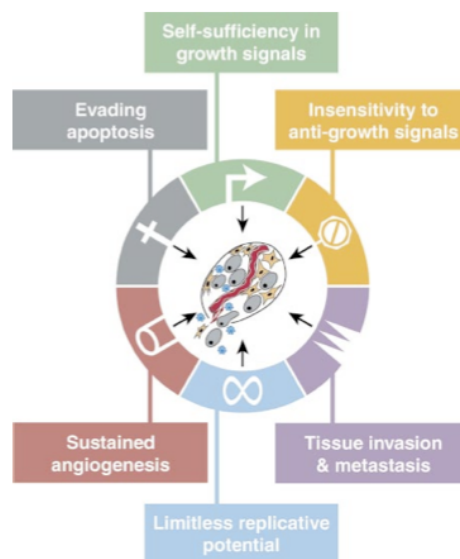


Figura 1| Capacità acquisite dalle cellule cancerose durante la progression tumorale. I vari tipi di cancro acquisiscono le stesse caratteristiche funzionali durante il loro sviluppo: evasione dall'apoptosi; autosufficienza nel generare segnali di crescita; insensibilità a segnali antiproliferativi; capacità angiogenica; potenziale replicativo illimitato; invasione dei tessuti con formazione di metastasi.

Per questi motivi, in questi ultimi anni, la ricerca si è concentrata sulla scoperta e sulla produzione di farmaci antitumorali il più possibile efficaci e specifici nel colpire le cellule neoplastiche. Ad oggi, sono molto frequenti regimi chemioterapici basati sull'utilizzo combinato di farmaci convenzionali, che

colpiscono il DNA, e farmaci denominati “intelligenti”, i quali permettono la selezione di un particolare tipo cellulare.

Le cosiddette *targeted therapy* sono terapie che prevedono l'utilizzo di farmaci definiti “intelligenti”; l'aspetto più interessante di questa categoria di farmaci consta nella loro straordinaria selettività d'azione³.

Questa selettività è indispensabile per disegnare una terapia mirata, in grado di interferire con la crescita del tumore senza danneggiare in maniera eccessiva i tessuti sani, a differenza di quanto avviene con la chemioterapia classica^{4,5,6,7}.

Questo tipo di farmaci blocca la crescita e la diffusione del tumore, interferendo con molecole specifiche coinvolte nella crescita e nella progressione tumorale. Focalizzando l'attenzione sui cambiamenti molecolari e cellulari che sono specifici del cancro, terapie oncologiche mirate possono essere più efficaci rispetto ad altri tipi di trattamento^{8,9}, e meno dannose per le cellule normali.

Molte terapie antitumorali mirate sono state approvate dall'Ente Governativo Statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici (US Food and Drug Administration o FDA) per il trattamento di specifici tipi di cancro. Ad esempio, una delle prime terapie utilizzate, è stata messa a punto per il cancro al seno, tramite la produzione di farmaci che legano ed inibiscono il recettore cellulare per l'ormone estrogeno HER2¹⁰, che nella maggior parte dei tumori maligni del seno è sovraespresso e richiesto per la crescita e lo sviluppo di queste cellule. Molti altri farmaci, con questa tipologia d'azione, sono in fase di sperimentazione preclinica (test *in vitro* ed esperimenti su animali *in vivo*); altri si trovano nella fase I di sperimentazione, per valutarne la sicurezza e la dose del farmaco su un gruppo ristretto di volontari.

Gli approcci chemioterapici basati sull'utilizzo di farmaci che bersagliano specificatamente una proteina sovraespressa nelle cellule tumorali rappresentano sicuramente un'ottima strategia per una serie di motivazioni:

1. Verrebbero colpite maggiormente le cellule tumorali in quanto sovraesprimono tale proteina; ciò ridurrebbe di molto la tossicità del farmaco;
2. Verrebbe aumentata l'efficacia del trattamento perché bersagliare una proteina essenziale per le cellule tumorali, ha come effetto quello di indurre queste cellule alla morte; infatti, se le cellule tumorali aumentano la sintesi di una determinata proteina, sicuramente essa svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della loro tumorigenicità. Per questo motivo si fa riferimento al fenomeno noto come *cellular addiction*, che si basa sul concetto che le cellule cancerose sono dipendenti della continua attività di un oncogene sovraespresso per mantenere il loro fenotipo maligno¹¹.

Bisogna, inoltre, tener presente che le cellule tumorali "lottano" costantemente per la sopravvivenza attuando una sorta di processo microevolutivo, caratterizzato dall'accumulo continuo di mutazioni al DNA, che permette loro di sfuggire alla morte per apoptosi, pur sempre restando ad un passo da essa.

Infatti, la stessa persistente stimolazione oncogenica, da cui dipendono, unita alla grave instabilità genomica ed alla devastazione interna dovuta alla presenza di proteine aberranti, fanno sì che esse si trovino sempre vicino alla soglia apoptotica¹² (Figura 2). Per questo motivo, il trattamento con farmaci che andranno ad inibire una proteina essenziale per queste cellule, potrebbe risultare determinante per la loro sopravvivenza ed avere l'effetto di indurle sicuramente a morte, cosa che non accadrebbe nelle cellule normali sane che si trovano molto lontane dalla soglia apoptotica (Figura 2). Questo approccio ridurrebbe di molto il fenomeno della tossicità del farmaco antitumorale in quanto determinerebbe una morte cospicua delle cellule tumorali e non di quelle sane¹².

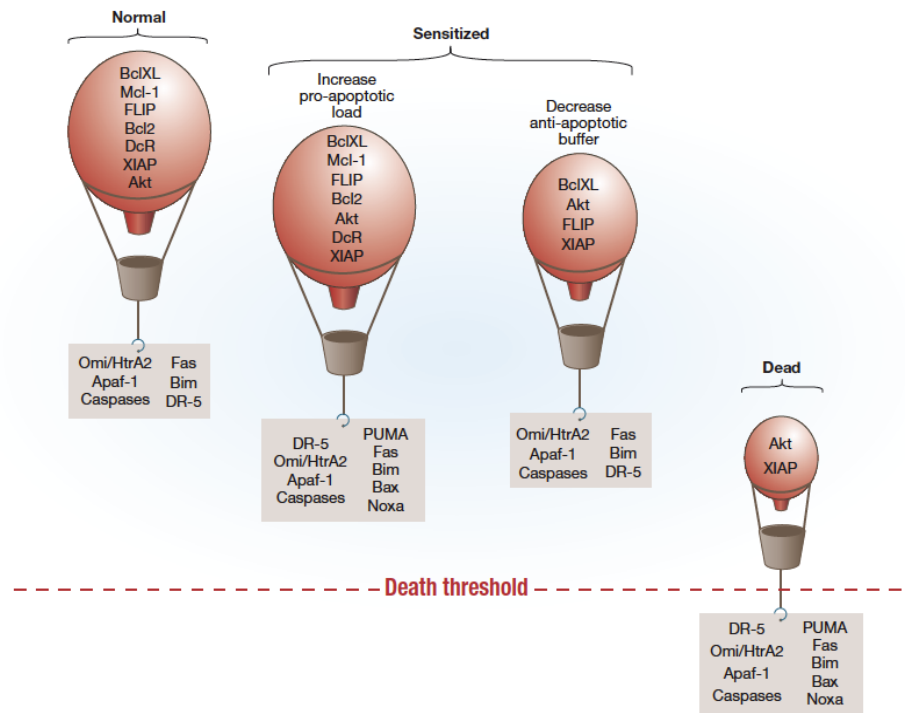


Figura 2 | Rappresentazione figurativa del concetto di “soglia apoptotica”. Le cellule neoplastiche si trovano molto vicine alla soglia apoptotica rispetto alle cellule sane. Ciò è dovuto al fatto che queste cellule sono sia esposte ad un ambiente altamente sfavorevole (ipossia e ambiente povero di nutrienti) e ad una grave devastazione interna dovuta alla presenza di vari danni genotossici e di proteine aberranti; nonostante questo, esse riescono ad evitare l’apoptosi grazie alla sovraespressione di proteine antiapoptotiche. L’inibizione di una proteina sovraespressa nelle cellule tumorali ed importante per la loro sopravvivenza, potrebbe favorirne il loro passaggio sotto soglia destinando queste cellule alla morte. Ciò non accade nelle cellule sane che normalmente si trovano molto lontane dalla soglia apoptotica per cui l’inibizione della stessa proteina avrebbe solo l’effetto di avvicinarle ad essa.

Precedenti studi hanno rivelato che la proteina Cockayne syndrome B (CSB) potrebbe rappresentare un *target* strategico per la terapia contro il cancro per i seguenti motivi:

1. CSB svolge un ruolo durante la riparazione del DNA in seguito a danni causati da diversi agenti genotossici, inclusi quelli usati comunemente durante i regimi chemioterapici basati sui composti del platino (cisplatino e oxaliplatino)¹³; perciò la sua inibizione determinerebbe una minore risoluzione dei danni al DNA indotti da questi agenti e contrasterebbe i fenomeni di farmacoresistenza;

2. CSB gioca un ruolo importante durante l'adattamento all'ipossia; la soppressione dell'attività di CSB potrebbe ridurre la capacità della massa tumorale di rispondere alla carenza di ossigeno che si verifica nello stadio di progressione di questa malattia¹⁴;
3. CSB agisce come antagonista di p53 e quindi potrebbe essere considerata una proteina antiapoptotica¹⁴; la sua sovraespressione nelle cellule tumorali potrebbe avere l'effetto di aumentarne la resistenza all'apoptosi; la sua inibizione, al contrario, renderebbe queste cellule più sensibili alla morte.

3.1 Informazioni generali della proteina CSB

Cockayne Syndrome B (CSB) è una proteina di 168-kDa appartenente alla famiglia SWI2/SNF2 di rimodellatori della cromatina¹⁵. Essa è costituita da 1493 amminoacidi e contiene sette motivi ATPasici consecutivi, conservati in tre classi di RNA e DNA elicasi, che costituiscono un dominio di legame nucleotidico (Figura 3). CSB presenta anche una regione acida a livello del N-terminale, seguita da una regione ricca in amminoacidi glicina in cui è contenuto un segnale di localizzazione nucleare¹⁵ (Figura 3).

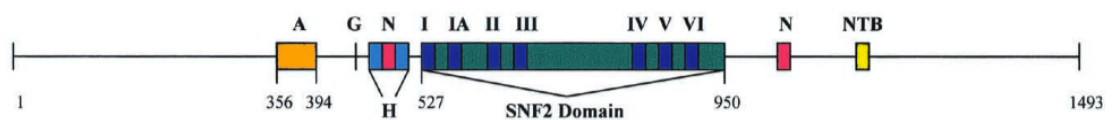


Figura 3 | Rappresentazione della struttura della proteina CSB. La proteina CSB possiede una regione acida al N-terminale (A) dall'amminoacido 356 al 394, una regione ricca in glicine (G), un segnale di localizzazione nucleare (N) fiancheggiato da delle regioni idrofiliche (H); nella regione centrale sono presenti sette motivi ATPasici consecutivi (I, Ia, II, III, IV, V e VI) dall'amminoacido 527 al 950, questa regione è altamente omologa alla famiglia delle proteine SWI2/SNF2. Nella regione C-terminale è presente un motivo di legame nucleotidico (NTB).

Questa proteina, quando mutata, dà origine ad una rara malattia autosomica recessiva nota come Sindrome di Cockayne (CS). Si tratta di una malattia multisistemica caratterizzata da ipersensibilità alla luce del sole (UV), grave insufficienza della crescita, cachessia (nanismo cachettico), vita breve e progressive anomalie del sistema nervoso che includono ritardo nello sviluppo psicomotorio, mentale e microcefalia (ridotto sviluppo del cranio)¹⁶.

Una caratteristica dei pazienti CS, che può essere usata per la diagnosi della malattia, è il mancato recupero di sintesi di RNA quando i fibroblasti di questi pazienti vengono irradiati con UV¹⁷. Infatti, nelle cellule normali la sintesi di RNA è inibita, in maniera temporanea, dopo l'esposizione ai raggi UV, ma a differenza delle cellule CS, esse recuperano il 90% dei livelli di sintesi di RNA circa 90 minuti dopo l'esposizione.

Questo difetto, delle cellule CS, è causato da un *deficit* che questi pazienti hanno in una sottovia del meccanismo di riparazione del danno al DNA per escissione nucleotidica (Nucleotide Excision Repair–NER), noto come meccanismo di riparazione associato alla trascrizione (Transcription Coupled Repair–TCR). In particolare il meccanismo TCR ha il compito di riparare velocemente le lesioni, quali quelle causate dalle radiazioni UV, presenti sul DNA dei geni trascrizionalmente attivi.

Queste lesioni possono causare l'arresto dell'enzima RNA polimerasi II a livello del sito del danno e portare all'interruzione della trascrizione di questi geni, determinando una massiccia diminuzione del processo di sintesi di RNA.

Infatti, il ruolo meglio caratterizzato della proteina CSB è quello che essa svolge durante il meccanismo di riparazione NER, in particolare nella sottovia TCR¹⁸.

Ad oggi è ormai noto che la maggior parte dei sintomi che mostrano i pazienti CS non può essere spiegata con la sola perdita di funzione del meccanismo TC-NER.

Studi più recenti hanno dimostrato, in realtà, che il ruolo della proteina CSB non è confinato al meccanismo di riparazione TC-NER, bensì CSB si è dimostrata una proteina multifunzionale che può agire attraverso differenti meccanismi d'azione che dipendono dal contesto funzionale e dal sito in cui la proteina opera.

Ad esempio, CSB interagisce e stimola l'assemblaggio di complessi proteici trascrizionali di tutte e tre le classi di RNA polimerasi nucleari, oltre che svolgere un

ruolo importante durante i meccanismi di replicazione e trascrizione del DNA tramite la sua funzione elicastica^{19,20,21}. Inoltre, CSB sembra avere un importante ruolo in un altro meccanismo di riparazione, chiamato *riparazione per escissione di basi* (BER), interagendo fisicamente e/o funzionalmente con diverse proteine che vi partecipano¹⁵. Recentemente è stato messo in evidenza il suo ruolo nel regolare negativamente l'attività dell'onco-soppressore p53 in seguito a *stress* cellulare e nell'indurre risposte adattative in seguito ad ipossia. Infine è stato dimostrato che CSB è un fattore essenziale per il differenziamento neuronale e la neuritogenesi²².

3.2 CSB: ruolo nel meccanismo di riparazione del DNA

L'enzima coinvolto nella trascrizione della maggior parte dei geni è la RNA polimerasi II. Il complesso trascrizionale, composto da diverse proteine tra cui la RNA polimerasi II, può arrestarsi a livello del DNA nel sito in cui è presente una lesione²³. Il persistere di questo complesso di proteine, nella regione in cui è presente un danno, determina il richiamo del meccanismo di riparazione associato alla trascrizione (TCR), un *pathway* specializzato e particolarmente veloce del meccanismo di riparazione per escissione nucleotidica, che è richiesto affinché ci sia il corretto ripristino del processo di sintesi degli mRNA. Il persistere del danno a livello del DNA determina l'arresto della fase di allungamento del mRNA di nuova sintesi da parte della RNA polimerasi II; ciò può portare a gravi conseguenze per la cellula, tra cui la sua morte per apoptosi.

L'interruzione della trascrizione porta, inoltre, all'attivazione del *pathway* di risposta al danno al DNA che coinvolge l'oncosoppressore p53 (Figura 4). Un insieme specifico di proteine, coinvolte nella segnalazione del danno al DNA, sono attivate per determinare l'arresto temporaneo a livello di uno specifico stadio del ciclo cellulare (*checkpoint* cellulare). L'attivazione di queste proteine permette alle cellule di disporre di un tempo maggiore, per riparare il danno prima di rientrare nella fase S del ciclo cellulare o nella mitosi. Se il danno non viene riparato lo stesso *pathway* attivato per la riparazione del DNA, che fa capo a p53, porterà all'attivazione di una serie di proteine che avvieranno il processo apoptotico all'interno della cellula²⁴ (Figura 5).

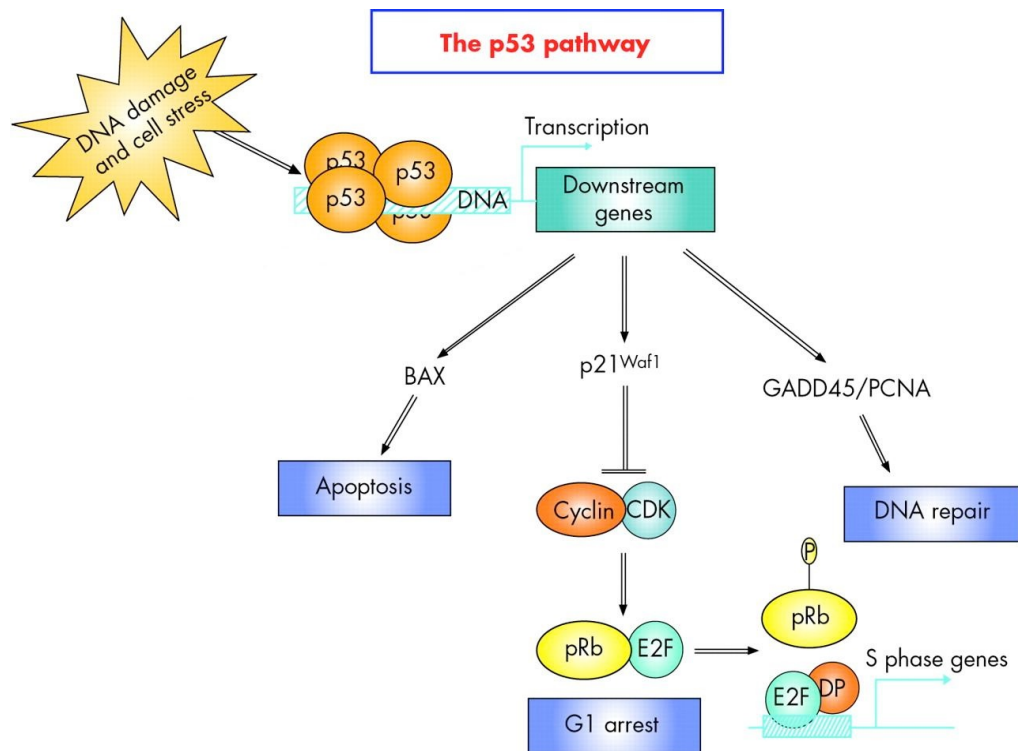


Figura 4 | Pathway della proteina p53. La proteina p53 viene attivata in seguito a danno al DNA e a varietipi di stress cellulari; il compito di questa proteina è quello di attivare la trascrizione di una serie di geni come ad esempio il gene waf-1, il gene codificante per la proteina BAX. La sintesi della proteina p21 determina l'arresto nella fase G1 del ciclo cellulare, per permettere alla cellula di riparare i danni presenti nel genoma. Inoltre, p53 attiva la trascrizione di un'altra proteina coinvolta nella riparazione del DNA e nell'inibizione dell'ingresso delle cellule nella fase S del ciclo cellulare: GADD45. Se la cellula non ripara il danno o se la lesione è troppo estesa, p53 attiva la trascrizione del gene codificante per la proteina BAX, la quale ha attività pro-apoptotica.

All'interno della cellula è presente un sottile equilibrio tra i processi che portano all'attivazione dei meccanismi di riparazione delle lesioni, per evitare l'apoptosi, e la successiva perdita delle segnalazione del danno al DNA. Se il meccanismo di riparazione TCR è troppo efficiente, le cellule sopravviveranno, ma potrebbero non avere a disposizione il tempo necessario per riparare tutte le lesioni prima che queste siano fissate in maniera permanente durante la replicazione del DNA: una condizione che promuove la cancerogenesi. D'altra parte un meccanismo di riparazione TCR meno efficiente potrebbe portare ad una eccessiva apoptosi: una condizione che promuove l'invecchiamento (Figura 5).

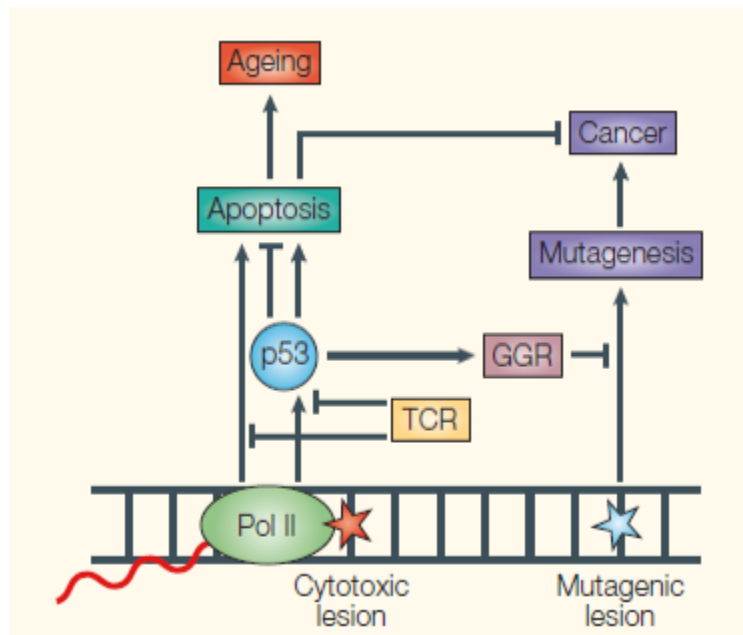


Figura 5 | Meccanismo di bilancio tra risposta al danno al DNA, cancro e senescenza cellulare. Una lesione a livello del DNA può essere sia citotossica che mutagenica, a seconda di dove è localizzata lungo il genoma. Se la lesione determina l'arresto della trascrizione, potrebbe portare alla morte della cellula ed essere perciò citotossica. Mentre, se la lesione è localizzata in una regione non trascritta del genoma, essa può non avere un effetto tossico se non prima che il DNA venga replicato e la lesione non venga trasformata in una mutazione. La lesione che determina l'arresto della trascrizione viene riparata dal meccanismo di riparazione TCR, mentre le lesioni mutageniche sono rimosse dal meccanismo GGR. Pazienti con difetti nel meccanismo TCR non presentano una predisposizione allo sviluppo del cancro; mentre individui che hanno un meccanismo GGR non efficiente, sono maggiormente soggette al cancro. A seconda del tipo cellulare e del livello di danno al DNA, l'induzione di p53 può o proteggere la cellula tramite l'arresto temporaneo della sintesi degli RNA o tramite la stimolazione della morte per apoptosi. Il pathway di risposta indotta da p53 e la conseguente attivazione della via apoptotica, nelle cellule deficienti per il meccanismo TCR, possono essere protettive contro il cancro, nonostante ciò questo tipo di protezione può portare ad un invecchiamento ed ad una degenerazione neurologica precoce.

Lesioni come dimeri di pirimidina indotti dai raggi UV o lesioni indotte da agenti alchilanti (come *cross-link* inter o intracatena causati da molecole come il cisplatino o dai suoi derivati), che determinano una grande distorsione dell'elica del DNA, se localizzate nel filamento che è trascritto di geni attivi, sono rimosse dal meccanismo di riparazione TCR; mentre simili lesioni localizzate in regioni non trascrizionalmente attive sono rimosse da un'altra sottovia del meccanismo NER: meccanismo di riparazione globale del genoma (GGR) (Figura 6).

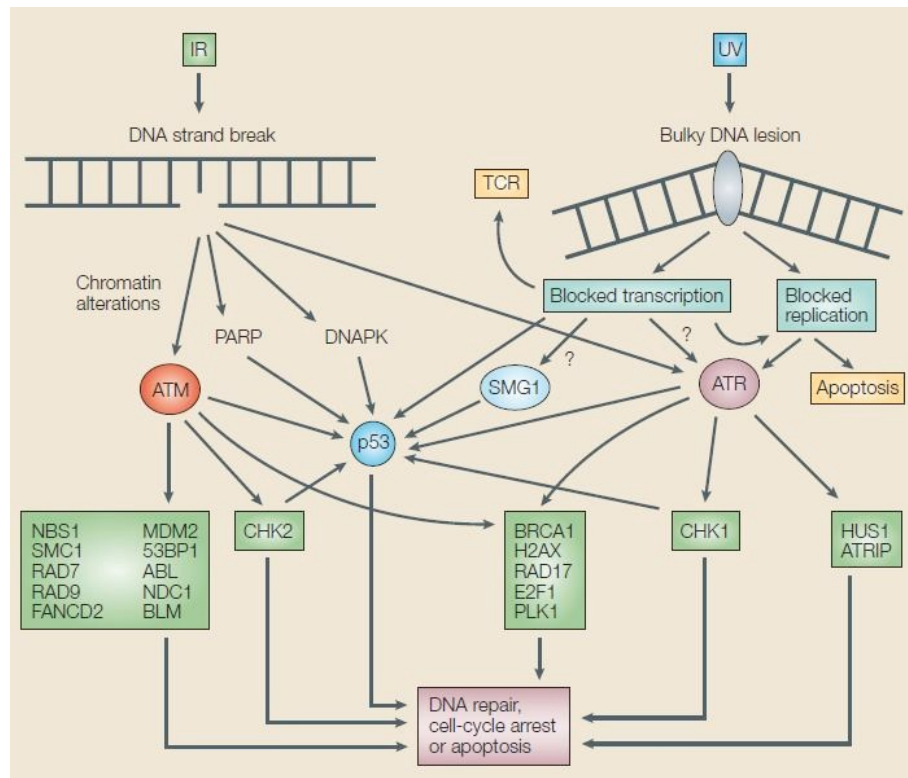


Figura 6 | Meccanismi di riparazione NER e TCR. Danni a livello del DNA come rotture dell'elica o lesioni che causano un ingombro sterico (ad esempio i dimeri di timidina prodotti dai raggi UV) attivano una serie di proteine tra cui ATM, ATR, e p53, che hanno a loro volta il compito di richiamarne altre coinvolte nei meccanismi di riparazione del DNA, arresto del ciclo cellulare e apoptosi.

Il meccanismo di riparazione TCR utilizza lo stallo della RNA polimerasi II, a livello della regione di DNA in cui è presente la lesione, per reclutare enzimi di riparazione; al contrario, il meccanismo GGR richiede proteine specifiche per la rilevazione di lesioni sul DNA ed il reclutamento di fattori per la riparazione del danno²⁵ (Figura 6).

Nel meccanismo di riparazione TCR, in cui è coinvolta la proteina CSB, l'abilità della lesione nell'indurre l'arresto della RNA polimerasi sembra essere critica.

L'enzima RNA polimerasi II, che staziona a livello del sito in cui è presente la lesione, deve essere rimosso per rendere la lesione accessibile al macchinario di riparazione; ciò richiede due fattori specifici del meccanismo TCR: le proteine CSB e CSA. Una volta richiamate queste due proteine, a livello del sito in cui è presente la lesione, sono reclutate le elicasi XPB e XPD, facenti parti del fattore trascrizionale TFIIH, che hanno il compito di rompere i legami ad idrogeno che sono presenti tra le basi del DNA ed aprire la doppia elica per un tratto di circa 30 paia di basi nella zona intorno alla lesione. La proteina XPA, reclutata subito dopo sul sito del danno,

probabilmente conferma la presenza del danno rilevando l'anomala struttura dello scheletro del DNA, mentre la proteina che lega il singolo filamento RPA, stabilizzando l'apertura della doppia elica del DNA legando il filamento non danneggiato. Il richiamo dei fattori successivi, ciascuno con una capacità mirata per la rimozione di una determinata lesione, permette un'alta specificità nella eliminazione del danno. Le endonucleasi XPG e ERCC1/XPF, rispettivamente, tagliano le estremità 3' e 5' del filamento danneggiato, generando un breve frammento di 24-32 oligonucleotidi che contiene la lesione e che viene eliminato. Il macchinario di replicazione a questo punto può completare la riparazione tramite l'inserimento di nuove basi nel tratto di DNA appena rimosso. Successivamente, l'intero complesso di riparazione viene disassemblato²⁵ (Figura 7).

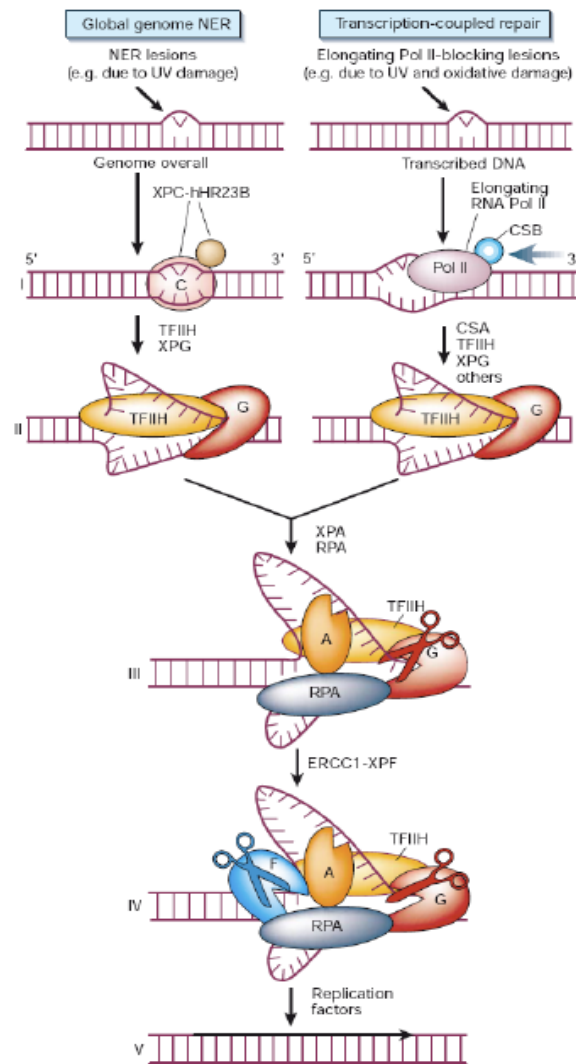


Figura 7 | Meccanismo di riparazione NER. I due meccanismi di riparazione differiscono soltanto nella prima parte del processo che consiste nella segnalazione del danno; la fase successiva di riparazione del danno procede, in ambedue le vie, in maniera uguale. Per il meccanismo di riparazione NER, che opera su tutto il genoma, il danno può essere rappresentato ad esempio, da un dimero di timidina causato dai raggi UV; la presenza di questa lesione richiama le proteine XPC, TFIIH e XPG sul sito del danno; viceversa, il meccanismo TCR opera a livello delle regioni trascritte dei geni; infatti, questo meccanismo di riparazione viene attivato in seguito allo stallo del RNA pol II a causa, ad esempio, di danni indotti dai raggi UV o danni ossidativi. Tra le proteine che sono richiamate sul sito della lesione vi sono CSA, CSB, TFIIH e XPG. In entrambi i meccanismi vengono poi richiamate le proteine XPA e RPA che, insieme ad altre, sono richieste per la rimozione del tratto danneggiato di DNA. Il frammento di DNA rimosso verrà poi sintetizzato ed il danno sarà completamente risolto.

Il persistere di queste lesioni a livello delle regioni trascritte dei geni determina la mancata produzione di proteine essenziali per la cellula e questo evento può essere fatale per la sua sopravvivenza²⁶. Inoltre, per evitare che i danni non riparati possano essere trasformati in mutazioni alla successiva fase di sintesi di DNA, la cellula che li possiede innesca un processo di autoeliminazione che la porterà alla morte. Questo processo si trova alla base del meccanismo che ci salvaguarda dalla possibilità di sviluppare tumori¹².

D'altra parte, anche un'eccessiva morte cellulare ha degli effetti deleteri per l'organismo quali l'invecchiamento precoce ed il mal funzionamento dei tessuti e degli organi colpiti.

Questo è quello che accade alle persone affette dalla sindrome di Cockayne (in cui la proteina CSB è mutata): questi individui, infatti, non presentano un aumento della predisposizione al cancro, a differenza di ciò che accade in individui affetti da sindromi in cui sono mutate altre proteine coinvolte nella riparazione del DNA, e questo può essere spiegato con il fatto che i difetti nel meccanismo TCR rendono le cellule incapaci di riparare i danni; ciò determina una eccessiva morte cellulare con conseguente invecchiamento precoce dei tessuti e degli organi¹².

3.3 CSB modula negativamente l'attività dell'onco-soppressore p53

La proteina CSB, oltre ad avere un ruolo fondamentale durante la riparazione del DNA, funziona anche come un fattore che può selettivamente influenzare la trascrizione di un gruppo di geni, in seguito a danno al DNA o a ipossia, tramite la modulazione negativa della funzione biologica di p53²⁷. Il fatto che CSB moduli negativamente l'attività della proteina pro-apoptotica p53, potrebbe conferirle un ruolo antiapoptotico a favore della sopravvivenza cellulare.

L'onco-soppressore p53, considerato il guardiano del genoma, garantisce l'integrità del genoma cellulare tramite la protezione dagli effetti dannosi delle lesioni al DNA. La proteina p53 è inoltre coinvolta nell'attivare e nel coordinare le risposte multiple che scaturiscono in una cellula se il danno non viene riparato; per questo motivo risulta il fattore principale coinvolto nell'induzione e nella regolazione della morte per apoptosi nelle cellule²⁶.

La proteina p53, inoltre, gioca un ruolo fondamentale nell'induzione della risposta a vari tipi di *stress*²⁸, quali ad esempio l'ipossia (condizione di carenza di ossigeno).

Il ruolo critico del gene p53 nel mantenere l'integrità del genoma è evidente se si considera il fatto che questo gene è alterato in molti tumori maligni, con una frequenza di mutazione che supera il 50%. Sebbene la proteina p53 sia molto importante per evitare lo sviluppo di tumori, una sua eccessiva attività può dare luogo ad invecchiamento precoce ed essere altrettanto dannosa per la vita dell'organismo.

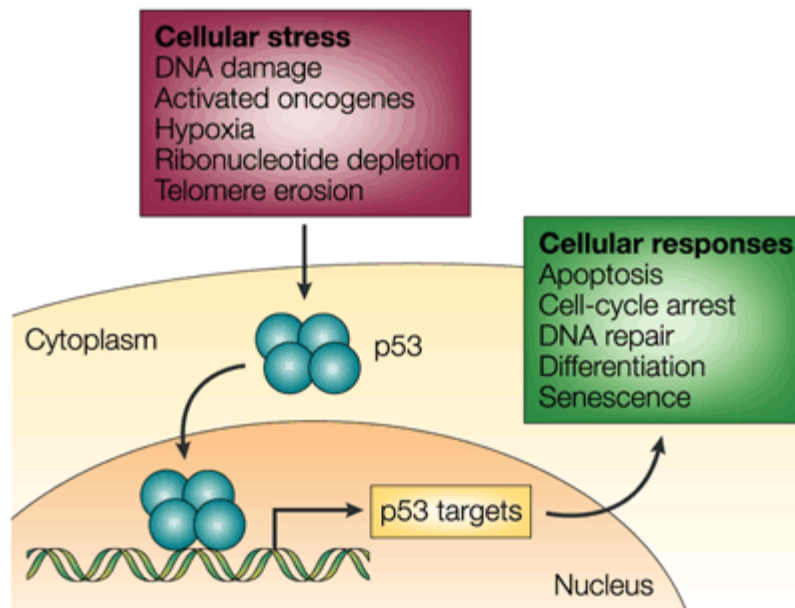
Questo spiega perché si sia evoluta una rete molto complessa di *feedback* negativi e positivi per modulare, in maniera molto fine, l'induzione e l'attività di questa proteina.

La proteina p53 è rapidamente indotta in seguito alla presenza di danno al DNA come lesioni causate dalle radiazioni ionizzanti, dai raggi UV, o dagli agenti chimici che inducono *cross-link*, o in seguito a *stress* cellulari quali ipossia e accorciamento telomerico (Figura 8). L'induzione di p53 è ottenuta tramite dei meccanismi che ne aumentano la stabilità e ne riducono il *turnover* grazie a delle modificazioni post-traduzionali. Queste modifiche consistono in fosforilazioni e

acetilazioni di vari residui amminoacidici. È stato dimostrato che la fosforilazione dell'amminoacido serina in posizione 15 e 20 di p53, in seguito a *stress* genotossici, ne compromette l'interazione con la proteina Mdm2, l'ubiquitina-ligasi E3 che è responsabile della sua degradazione per via proteasomale; ciò determina un aumento dei livelli della proteina p53 all'interno della cellula²⁸.

Le modifiche post-traduzionali, oltre ad inibirne la degradazione, fanno sì che p53 diventi attivo come fattore trascrizionale. Infatti, questa proteina può essere fosforilata da una grande varietà di chinasi tra cui DNA-PK, ATM, JNK MAP chinasi e Cdks, ed agire poi, sotto forma di omotetramero, come fattore trascrizionale legandosi a livello dei promotori dei suoi geni bersaglio. Le differenti fosforilazioni oltre che modificare la specificità di legame di p53 al DNA, possono anche modularne l'efficienza di attivazione per i differenti geni bersaglio²⁹.

Quando la proteina p53 diventa attiva trascrizionalmente, è in grado di regolare l'espressione di una vastità di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, dell'apoptosi e della riparazione del DNA²⁹ (Figura 8).



*Figura 8 | **Ruolo della proteina p53.** Vari stress cellulari quali danno al DNA, attività di alcuni oncogeni, ipossia, erosione delle estremità telomeriche e deplezione ribonucleotidica possono portare all'attivazione di p53 che agisce come fattore trascrizionale andando ad attivare alcuni geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA, nella senescenza e nell'apoptosi.*

Per svolgere la sua funzione di attivatore trascrizionale p53 interagisce con una serie di co-attivatori trascrizionali tra cui l'acetilasi istonica p300³⁰.

Studi recenti hanno messo in evidenza il fatto che la proteina CSB può modulare negativamente l'interazione tra p53 e p300¹⁴. Infatti, recentemente è stata dimostrata la presenza di un sito di legame competitivo di CSB e p300 per p53. Il legame dell'una o dell'altra proteina porterà a delle risposte cellulari differenti. L'associazione della proteina CSB a p53 determina il rilascio del fattore p300 da p53. Come risultato, l'interazione tra p53 e p300 e, quindi, anche l'attività di fattore trascrizionale di p53, risultano estremamente ridotte dalla presenza di CSB. È probabile che la proteina CSB, modulando l'attività di p53 in seguito a *stress* cellulari, possa riequilibrare la risposta fisiologica verso la proliferazione e la sopravvivenza cellulare invece che verso l'arresto del ciclo cellulare e la morte. Al contrario, l'assenza della proteina CSB aumenterebbe il legame di p53 con p300 causando la stabilizzazione di p53 e l'attivazione dei suoi geni bersaglio, compresi quelli coinvolti nell'apoptosi¹⁴.

Inoltre, sembrerebbe che il legame di CSB con la proteina p53 abbia un ruolo nello stabilizzare il complesso ubiquitina E3 ligasi (Mdm2), importante per la degradazione di p53 per via proteasomale²⁷. Nelle cellule mutate per CSB è stata rilevata, infatti, una elevata induzione di p53. Si pensa che l'elevato e prolungato accumulo di questa proteina all'interno della cellula sia dovuto a dei difetti nella sua ubiquitinazione, lo *step* cruciale richiesto per avviare le proteine verso la degradazione proteasomale.

Questo farebbe pensare che, nelle cellule in cui è mutata CSB, l'ubiquitinazione di p53 non avvenga correttamente; ciò porterebbe ad un maggior accumulo di questa proteina ed ad un conseguente aumento dell'espressione dei geni da essa regolati. Il fatto che si osservano elevati livelli di p53, quando la proteina CSB è mutata, spiegherebbe anche il fatto che gli individui affetti dalla sindrome di Cockayne mostrano un invecchiamento precoce di tessuti ed organi.

In conclusione, la presenza di CSB avrebbe così duplici effetti all'interno della cellula: determinerebbe il rilascio del fattore p300 da p53, arrestando l'attività di quest'ultimo nell'attivare i suoi geni bersaglio ed indurrebbe una degradazione di p53 per via proteasomale²⁷. Entrambi questi eventi causano un aumento della proliferazione e della sopravvivenza cellulare ed evitano l'arresto del ciclo cellulare e la morte.

La sovraespressione della proteina CSB nelle cellule tumorali potrebbe, perciò, avere effetti estremamente vantaggiosi in termini di proliferazione e sopravvivenza cellulare; la sua inibizione, in queste cellule, determinerebbe un ripristino dell'attività pro-apoptotica di p53³¹.

La mancanza di p300 disponibile, nelle cellule CSB-deficienti, spiegherebbe anche il *deficit* generalizzato di capacità trascrizionale che caratterizza le cellule mutate per CSB in seguito a *stress* genotossico. L'ipotesi fino ad ora più accreditata è quella secondo la quale l'incapacità nel ripristinare la trascrizione nelle cellule CSB^{-/-} sia da ricercarsi nel *deficit* del meccanismo di riparazione TCR. Un'altra ipotesi, molto interessante, attribuirebbe invece la causa del mancato ripristino della trascrizione all'iper-attivazione della risposta p53 e al conseguente stato di iper-acetilazione dei promotori regolati da p53. Questo stato comprometterebbe l'attivazione degli altri

promotori, contribuendo allo spegnimento generalizzato del processo di trascrizione. In accordo con questo, si è notato che, nelle cellule CSB^{-/-}, in seguito a irradiazione con raggi UV, né la RNA-polimerasi II né altri fattori trascrizionali associati vengono reclutati a livello dei promotori di diversi geni, inclusi alcuni geni *housekeeping*. Inoltre, anche l'acetilazione degli istoni associati a questi geni risulta ridotta¹³.

Come spiegato sopra, nelle cellule CS, in seguito a differenti tipi di *stress*, quali danno ossidativo e raggi UV, i livelli della proteina p53 rimangono stabilmente *up-regolati* ed è stato dimostrato che CSB modula negativamente l'attività di p53. L'*up-regolazione* permanente di p53 non è ottenuta a livello trascrizionale, ma è una conseguenza di un *deficit* nella sua ubiquitinazione e quindi degradazione. Questo si verifica perché CSB, insieme con CSA e l' E3-ubiquitina-ligasi Mdm2, fa parte di un complesso che ubiquitina p53, che destina questa proteina alla sua degradazione per via proteasomale. È interessante notare che p53 lega il promotore del gene *csb* e controlla trascrizionalmente la sua espressione, creando così un *feedback loop* negativo che riporta p53 a livelli basali. Sembra quindi che, quando CSB manca, questo sistema risulti compromesso e incapace di sostenere e contrastare la massiva *up-regolazione* di p53 che si verifica in seguito a diversi tipi di *stress* e che indirizza la cellula verso l'apoptosi³¹.

3.4 CSB: ruolo nell'angiogenesi e nell'adattamento alle condizioni di ipossia

È stato recentemente scoperto il ruolo chiave che la proteina CSB svolge nell'angiogenesi e nella risposta di adattamento a condizioni di ipossia¹⁴. Con il termine angiogenesi si intende l'insieme di tutti quei processi coinvolti nella formazione di nuovi vasi sanguigni per irrorare una zona di tessuto in cui si ha una carenza degli stessi. La mancanza di un numero appropriato di vasi sanguigni può portare all'ipossia, una condizione che insorge quando il normale apporto di ossigeno ai tessuti fallisce e non si riesce a soddisfare la richiesta di questa molecola a livello cellulare. Essa può verificarsi sia in condizioni fisiologiche che patologiche come, ad esempio, meccanismi di infiammazione o presenza di tumori solidi.

In quest'ultimi, l'attivazione dell'angiogenesi, che determina lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni, ristabilisce il giusto apporto di ossigeno e risulta critica per il proseguimento della tumorigenesi³².

Un importante mediatore dello *stress* ipossico è p53³³: in seguito a deprivazione di ossigeno, p53 viene stabilizzato tramite una serie di modificazioni post-traduzionali ed in questa maniera viene inibita la sua degradazione proteasomale. L'aumento dei livelli di p53 porta ad un incremento della trascrizione dei geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, come ad esempio p21, e all'eventuale espressione di geni coinvolti nell'apoptosi (Figura 8).

A contrastare l'attività di p53 vi è un altro mediatore della risposta ipossica: il fattore indotto dall'ipossia (HIF-1) che promuove, invece, la trascrizione di geni coinvolti nell'adattamento a bassi livelli di ossigeno attraverso il legame di una o più regioni *enhancer* (elementi di risposta all'ipossia o HRE) presenti sui promotori dei suoi geni bersaglio^{14,32}.

La proteina HIF-1 è un eterodimero composto da una subunità stabile, HIF-1 β , ed una subunità altamente instabile, HIF-1 α (Figura 9). La subunità HIF-1 β è costitutivamente presente all'interno della cellula, la subunità α , invece, è presente solo in seguito ad attivazione del *pathway* di risposta all'ipossia.

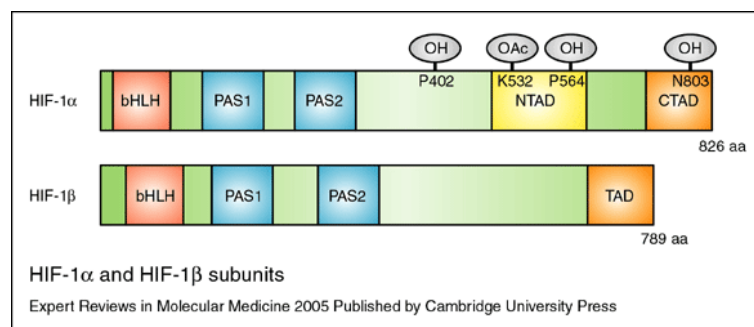


Figura 9 | Subunità del fattore HIF-1. Le subunità del fattore indotto dall'ipossia, HIF-1α e HIF-1β, contengono un dominio basico elica-giro-elica (bHLH) e due domini PER-ARNT-SIM (PAS1 e PAS 2) a livello della loro regione N-terminale. La subunità HIF-1β, inoltre, contiene un dominio TAD (dominio di transattivazione) nella regione C-terminale. Le posizioni in cui avvengono le modificazioni post-traduzionali, come idrossilazione e acetilazione in HIF-1 si trovano in un motivo conservato. L'idrossilazione di due residui di prolina (a livello dell'aminoacido 402 e 564) e l'acetilazione della lisina 532 marcano la subunità α per la degradazione da parte della proteina VHL (prodotto del gene soppressore dei tumori Von Hippel-Lindau). Inoltre l'idrossilazione dell'aminoacido 803 a livello della regione C-terminale nel dominio CTAD (dominio di attivazione C-terminale) di HIF-1α inibisce il reclutamento dei coattivatori richiesti per l'attività trascrizionale di HIF-1.

Quando i livelli di ossigeno sono elevati, specifici residui di prolina della subunità α sono idrolizzati tramite enzimi che sono ossigeno dipendenti (appartenenti alla superfamiglia EGL-9/PHD). Le proline idrolizzate a livello del motivo conservato LXXLAP (L= leucina, X= qualunque aminoacido e A= alanina P= prolina) presente nella regione C-terminale di HIF-1α aumentano la sua affinità alla proteina, soppressore tumorale, VHL che fa parte del complesso E3 ubiquitina ligasi che lega e marca le proteine per la degradazione proteosomale (Figura 9). In questo modo, se i livelli di ossigeno sono elevati, viene mantenuta bassa la presenza della subunità α di HIF-1 e non vengono attivati i geni per la risposta di adattamento all'ipossia³⁴.

Invece, bassi livelli di ossigeno inducono la stabilizzazione della subunità HIF-1α tramite meccanismi post-traduzionali; di conseguenza, i livelli dell'eterodimero attivo HIF-1 aumentano e HIF-1 è così in grado di interagire con il cofattore trascrizionale p300 e legare i promotori HREs. La proteina HIF-1 può, così, prevenire la morte cellulare inducendo risposte adattative tramite la promozione della trascrizione di geni tra cui VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) ed EPO (eritropoietina) i quali promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare¹⁴ (Figura 10).

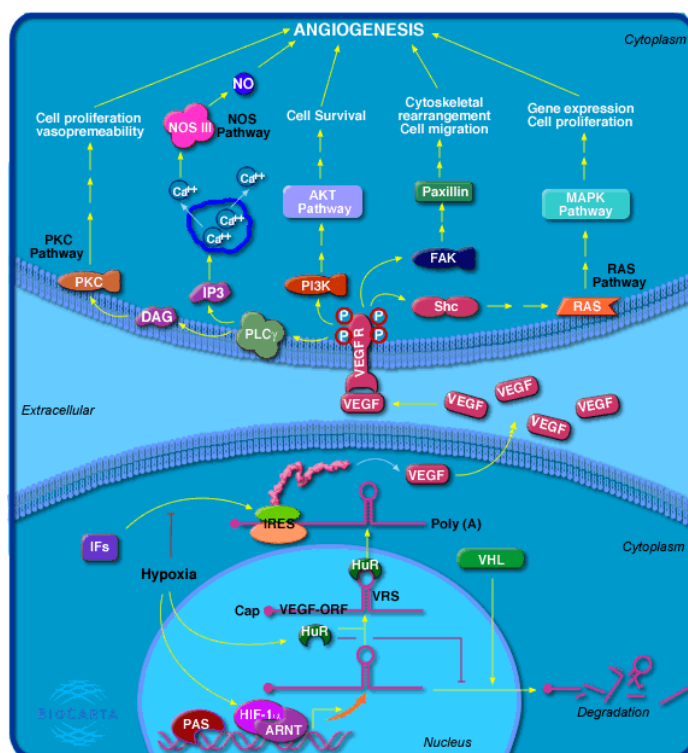


Figura 10 | Azione autocrina del fattore VEGF. In seguito a stress ipossici la cellula attiva il fattore HIF-1 il quale si lega ai promotori dei suoi geni bersaglio, tra i quali è presente il gene codificante per il fattore VEGF. Quest'ultimo verrà rilasciato dalla cellula ed indurrà delle risposte adattative sulle cellule vicine tramite il legame con il suo recettore (VEGFR). Il legame del fattore al VEGFR determina l'inizio della trasduzione dei segnali tramite l'attivazione di differenti pathway di segnalazione intracellulare (RAS pathway, PKC pathway e AKT pathway). Tutto ciò indurrà molteplici effetti all'interno della cellula, tra cui l'aumento della proliferazione, della sopravvivenza e della migrazione cellulare.

HIF-1 aumenta anche la trascrizione del gene *housekeeping* GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi), un enzima importante sia nella glicolisi che nella gluconeogenesi (sintesi di glucosio a partire dalle proteine). GAPDH è un enzima chiave nella conversione del glucosio ad acido piruvico, che è un importante stadio nel metabolismo dei carboidrati; la sua sovraespressione, in seguito ad ipossia, conferma l'aumento del metabolismo messo in atto dalle cellule endoteliali per far fronte alla sintesi di nuovi vasi sanguigni³⁴.

La sintesi di queste proteine ad opera del fattore HIF-1, attivato in seguito a stimoli ipossici, permetterà alle cellule di sopravvivere alla carenza di ossigeno e stimolare la sopravvivenza e la sintesi di nuovi vasi sanguigni.

Sia il fattore HIF-1 che la proteina p53, per promuovere la loro attività trascrizionale, legano il cofattore p300 che è presente in quantità limitate all'interno della cellula.

La proteina CSB svolge un ruolo fondamentale proprio nel ridistribuire il fattore p300 tra le due proteine in competizione per esso: p53 e HIF-1¹⁴.

Anche i livelli della proteina CSB aumentano in seguito ad ipossia ed è proprio il fattore HIF-1 attivo ad indurre la trascrizione (Figura 11). L'azione di CSB viene svolta su p53, in quanto interagendo con questa proteina, ne determina il rilascio dal fattore p300. In questo modo p300 è reso maggiormente disponibile per il legame con il fattore HIF-1 per l'attivazione dei suoi geni bersaglio¹⁴ (Figura 11).

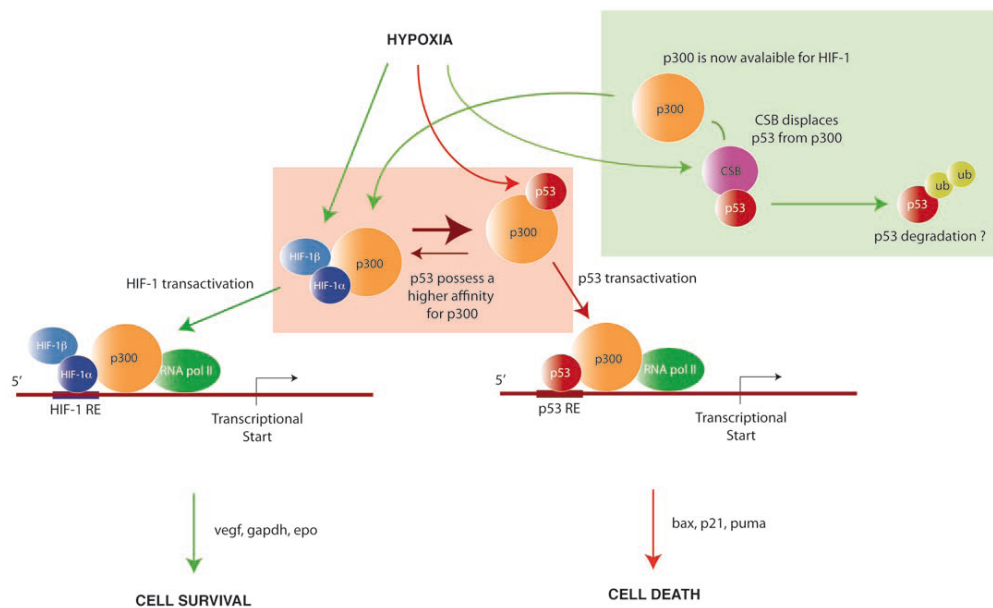


Figura 11 | Risposte cellulari indotte da stress ipossici. Stress ipossici attivano il fattore di trascrizione HIF-1 e l'antagonista p53. Quando i livelli di p53 si innalzano, viene attivata la trascrizione di geni che determinano l'arresto del ciclo cellulare, come ad esempio p21, o geni che inducono l'apoptosi come Bax. Alternativamente, HIF-1 può prevenire la morte cellulare ed indurre risposte adattative tramite la promozione della trascrizione di geni come VEGF, GAPDH, i quali favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione. La regolazione di molte proteine richieste sia per portare la cellula verso la morte cellulare, tramite p53, sia per indurre l'adattamento all'ipossia, tramite HIF-1, avviene a livello genico tramite il legame dei rispettivi fattori (p53 o HIF-1) presso i promotori dei loro geni bersaglio. Diversi studi suggeriscono che p53 possa competere con HIF-1 per la quantità limitante del coattivatore trascrizionale, acetiltransferasi, p300. CSB, anch'essa indotta in seguito ad ipossia, interagisce con p53 e così rilascia il fattore p300 da p53. In questo modo, CSB modula l'attività di p53 e riequilibra le risposte fisiologiche verso la proliferazione e la sopravvivenza cellulare invece che verso l'arresto del ciclo cellulare e la morte. In contrasto, l'assenza di CSB aumenterebbe il legame di p53 a p300 causando la stabilizzazione di p53 e l'attivazione dei suoi geni bersaglio, inclusi quelli coinvolti nell'apoptosi.

Di fatto, CSB modula l'attività di p53 e riequilibra le risposte fisiologiche verso la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, rendendo più disponibile il fattore p300 a HIF-1. Al contrario, l'assenza della proteina CSB porta ad un aumento del legame del fattore p300 con p53 determinando l'attivazione dei suoi geni bersaglio, inclusi quelli coinvolti nella morte cellulare^{14,35} (Figura 12).

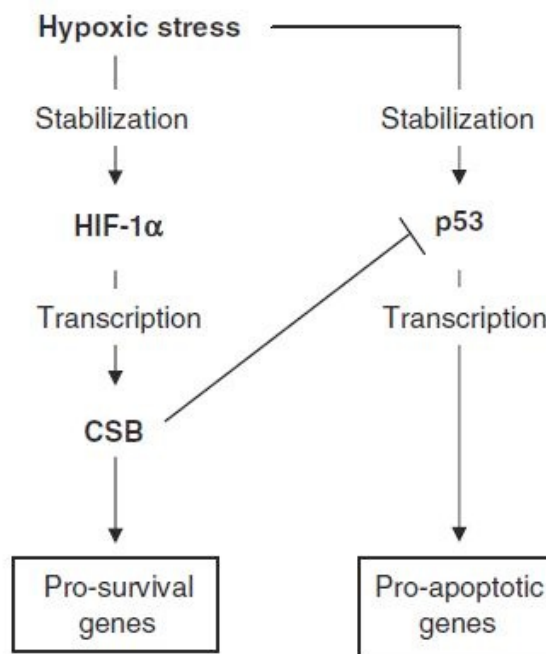


Figura 12 | La proteina CSB fa parte del complesso meccanismo di feedback che modula l'attività trans-attivatrice di p53. Stress ipossici inducono un aumento della trascrizione dei geni controllati sia da HIF-1, tramite la stabilizzazione della subunità HIF-1 α , che di p53. CSB, la cui trascrizione è sotto il controllo della proteina HIF-1, tramite la riduzione dell'attività di p53, riequilibra le risposte fisiologiche verso la proliferazione cellulare e la sopravvivenza invece che verso l'arresto del ciclo cellulare e la morte.

In accordo, è stato di recente dimostrato che le cellule mutate per CSB non sono capaci di rispondere in maniera corretta all'ipossia, nonostante avvenga il normale reclutamento del fattore HIF-1 a livello dei promotori di alcuni geni, come VEGF e GADPH, coinvolti nella risposta all'ipossia¹⁴. È stato dimostrato che gli eventi successivi al richiamo del fattore HIF-1 a livello dei promotori di questo geni, come il reclutamento della RNA polimerasi II, del fattore TFIIB e di p300 non avvengono correttamente; ciò porta ad una insufficiente risposta alle condizioni di ipossia.

Si è, dunque, ipotizzato che CSB oltre a giocare un ruolo durante la riparazione e replicazione del DNA, abbia anche un ruolo come fattore principale di *switch* che

può selettivamente influenzare la trascrizione di un set di geni, dopo danno o *stress* cellulare, tramite la modulazione della funzione di p53³⁵ (Figure 11 e 12).

Il fatto che la proteina CSB giochi un ruolo così importante nell'angiogenesi, ha aperto nuovi orizzonti per il suo utilizzo come *target* nelle terapie tumorali.

L'ipossia, infatti, si verifica negli stadi precoci dello sviluppo del tumore, prima delle metastasi, quando la massa tumorale diventa più grande di 2mm e non è più sostenuta dalla preesistente vascolarizzazione. La capacità di sopravvivere in condizioni d'ipossia è una delle differenze fisiologiche fondamentali tra cellule tumorali e cellule normali. Infatti, i geni indotti dall'ipossia regolano una serie di processi, inclusa la proliferazione cellulare, angiogenesi, metabolismo, apoptosi e migrazione.

CSB sembra svolgere un ruolo essenziale nel coadiuvare le risposte indotte da HIF-1. Le cellule tumorali, sovraesprimendo CSB, sono in grado di rispondere in maniera molto efficiente all'ipossia. La sua inibizione, dunque, risulterebbe critica per arrestare la rivascolarizzazione in atto nella massa tumorale, facendo diventare questa proteina un valido *target* per la terapia antitumorale.

3.5 La proteina CSB è un fattore essenziale per il differenziamento neuronale e la neuritogenesi

Una caratteristica clinica della sindrome di Cockayne è la neurodegenerazione dovuta alla perdita della struttura o della funzione neuronale in seguito a morte apoptotica²². Il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo di una malattia neurodegenerativa è l'invecchiamento. Con l'età spesso si assiste ad un declino del volume e della funzione cerebrale che, alla stregua di quanto accade nelle malattie neurodegenerative, può essere attribuito alla permanente perdita di neuroni. L'osservazione, nei pazienti CS, dei sintomi neurologici rivelati sia alla nascita o durante la prima infanzia solleva la possibilità che CSB possa avere un ruolo fondamentale nella regolazione dei programmi trascrizionali che governano la plasticità ed il mantenimento del sistema nervoso centrale (perinatale e post natale) durante la vita pediatrica.

L'omeostasi dei tessuti cerebrali richiede la sostituzione e la protezione di tutti i tipi cellulari neuronali, comprese le cellule staminali/progenitrici, dal danneggiamento del DNA sia di natura esogena che endogena, quali danno ossidativo. E' chiaro quindi che il non corretto funzionamento di entrambi questi processi, neurogenesi e riparazione del DNA, può facilmente determinare la neurodegenerazione che si osserva nei pazienti Cockayne²².

Nei pazienti CS, la neurodegenerazione è maggiormente pronunciata nel cervelletto con una severa perdita dei neuroni del Purkinje e dei granuli e più lievemente nel talamo e nei nuclei dei gangli della base³⁶.

Deficit nel meccanismo di riparazione del danno al DNA, in assenza di CSB, possono essere responsabili della neurodegenerazione che si osserva nei pazienti Cockayne?!

Il sistema di riparazione BER (*Base Excision Repair*) è attivo nei neuroni del sistema nervoso centrale e, dato il suo ruolo primario nella riparazione delle lesioni di tipo ossidativo, è stato ipotizzato che la perdita della sua funzionalità possa essere una delle cause alla base dell'insorgenza di tali disordini neurodegenerativi. E' stato dimostrato che la proteina CSB interagisce fisicamente e/o funzionalmente con diverse proteine coinvolte nel meccanismo BER e ciò fa pensare che parte dei tratti fenotipici che caratterizzano i pazienti CS siano causati anche dal ruolo che questa

proteina svolge in questo meccanismo di riparazione del DNA¹⁵, oltre che nel meccanismo di riparazione TCR.

Infatti, le cellule CS, in seguito a *stress* ossidativo, mostrano un maggiore accumulo di danno che potrebbe essere dovuto sia ad una riduzione della trascrizione dei geni BER sia ad una diretta interazione di CSB con le proteine di riparazione.

Queste osservazioni rivelano un ruolo chiave di CSB nel coordinare le attività di regolazione della trascrizione e rimodellamento della cromatina richieste in queste particolari cellule²². Rimane da comprendere se questo *deficit* nella riparazione di alcuni danni al DNA, quali quelli causati dallo *stress* ossidativo, sia in qualche modo implicato nella neurogenesi adulta.

Nel laboratorio in cui è stata svolta questa tesi di dottorato, recentemente è stato dimostrato come la riduzione stabile dell'espressione di CSB influenzi il potenziale differenziativo neuronale in un modello di cellule progenitrici staminali umane²². In particolare, come si può vedere dalle Figure 13 e 14, nelle cellule silenziate per CSB sono compromessi la polarizzazione cellulare e il processo di crescita neuritica ad essa associato (Figure 13 e 14).

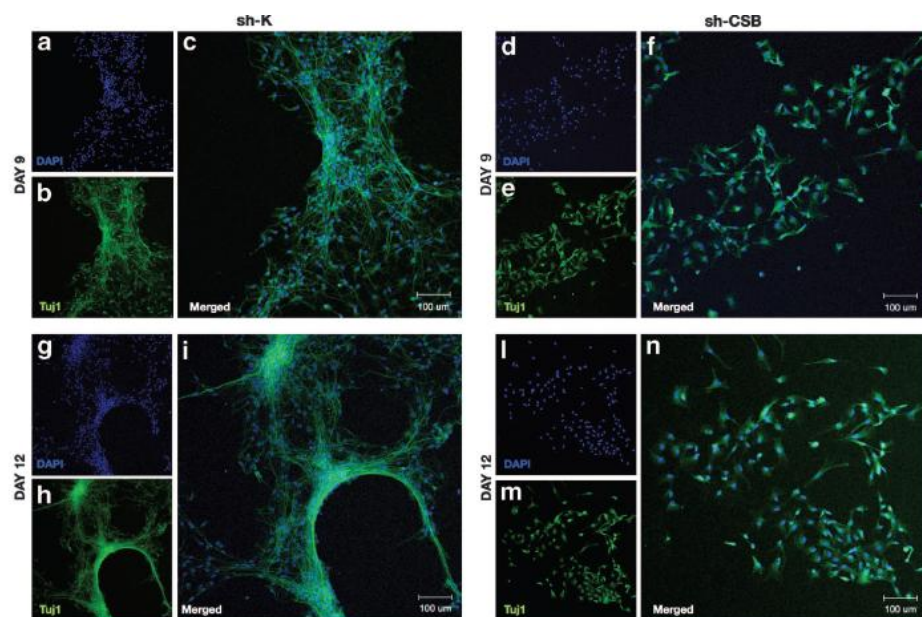


Figura 13 | Cellule staminali neurali indotte al differenziamento. Esperimenti d'immunofluorescenza effettuati marcando le cellule con Tuj1 (marker neuronale) mostra come nelle cellule neurali, silenziate per la proteina CSB, (D-F e L-N) sia inibito lo sviluppo di formazioni assionali e dendritiche a differenza di quanto accade nelle cellule wild-type (A-C e G-I).

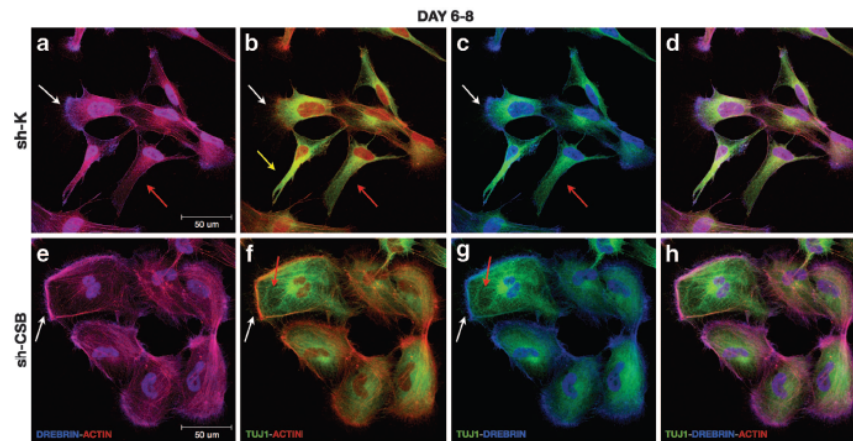


Figura 14 | Formazione dei processi neuritici in presenza (cellule sh-K) e in assenza (cellule sh-CSB) di CSB. A-D) Nelle seguenti immagini, acquisite al microscopio confocale, le frecce indicano tre diversi stadi del processo di outgrowth neuritico durante il differenziamento neuronale: formazione del cono di crescita (freccia bianca), allungamento del cono di crescita neoformato (freccia rossa) e fascicolazione dei microtubuli attorno al neurite in crescita (freccia gialla). E-H) Nelle cellule silenziate per CSB: la freccia bianca indica la mancanza di destabilizzazione della rete di actina subcorticale e la freccia rossa indica l'assenza di avanzamento dei microtubuli, necessari per direzionare la formazione del cono di crescita.

E' ragionevole assumere che un difetto nello sviluppo postnatale della corteccia prefrontale, dovuto alla mancanza di neurogenesi postnatale, può risultare in caratteristiche quali la microcefalia o la degenerazione del cervelletto tipiche dei pazienti CS. Allo stesso modo, difetti della neurogenesi nella zona subcorticale possono essere responsabili dell'ipomielinizzazione osservata negli stessi.

Dato che i difetti neurologici si manifestino solo dopo la nascita con sviluppo intrauterino normale, ciò fa pensare che il gene *csb* esplichi le sue funzioni durante la vita extrauterina quando cioè i vasi sanguigni dei bambini CS non sono più irrorati dall'ossigeno fornitogli dalla madre. Sappiamo che le cellule CS mostrano dei *deficit* nella risposta a condizioni d'ipossia, quindi una mancata risposta alla carenza di ossigeno potrebbe rappresentare un ostacolo per i pazienti CS. Questa scoperta potrebbe avere notevoli implicazioni nella neurodegenerazione poiché nel cervello uno stato d'ipossia maggiore che in altri organi o tessuti può stimolare il metabolismo dell'ossigeno con produzione di ROS responsabile dell'accumulo di danno al DNA e successiva senescenza o morte cellulare.

Un altro modello proposto per spiegare la neurodegenerazione che si osserva nei pazienti CS si basa sull'associazione di CSB con la RNA polimerasi II e il fattore TFIIH²⁰. Il ruolo di CSB potrebbe essere quello di mediare lo *switching* tra l'azione di fattore di trascrizione e di riparazione di TFIIH. In assenza di danno al DNA, TFIIH localizza sui promotori dei geni con la RNA polimerasi II e altri fattori di trascrizione, mentre in presenza di danno al DNA TFIIH viene reclutato per l'associazione con proteine di riparazione del complesso NER.

Dato che la maggior parte del genoma delle cellule neuronali, con eccezione della cellule della glia, viene trascritto, esse mostrano elevata sensibilità ai difetti di trascrizione. In questo caso la sintomatologia neurologica sarebbe quindi da implicarsi alla riduzione della trascrizione a causa del permanente reclutamento del fattore TFIIH sul sito della riparazione del danno al DNA²².

4. RISULTATI

4.1 La proteina CSB è sovraespressa nelle cellule tumorali

Per valutare i livelli di espressione della proteina CSB abbiamo effettuato un'analisi di Western Blot su diverse linee tumorali. Abbiamo analizzato l'espressione di CSB in linee cellulari tumorali umane di varia origine: vescica (MGH e USB), cervice uterina (HeLa), prostata (PC3) e ghiandola mammaria (T47D e MCF7). Questi dati sono stati confrontati con i valori di espressione della proteina CSB ottenuti da linee cellulari normali umane: fibroblasti primari (C3PV), cellule epiteliali della prostata immortalizzate (RWPE1) e cellule epiteliali della ghiandola mammaria (MCF 10A)³⁶. Come mostrato in Figura 15 A-B, l'analisi di Western Blot, effettuata utilizzando estratti cellulari totali, ha rivelato un aumento dei livelli di espressione della proteina CSB in tutte le linee cellule tumorali analizzate (MGH, USB, HeLa, PC3, T47D e MCF7), rispetto alle linee cellulari normali (C3PV, RWPE1 e MCF 10A). Tra le linee tumorali disponibili nel nostro laboratorio solo due linee di cancro al seno (ZR-75-1 e MDA-MB-231) non mostravano un aumento significativo dell'espressione della proteina CSB (dati non mostrati).

Come mostrato nell'immagine del Western Blot (Figura 15-A), l'aumento dei livelli di espressione è uguale sia per la proteina CSB che per la sua isoforma nota come CSB/PGBD3, in cui i primi 5 esoni di CSB subiscono uno splicing alternativo con il trasposone PGBD3. Ciò suggerirebbe un meccanismo trascrizionale alla base della overespressione di CSB, poiché entrambe le proteine sono sotto il controllo dello stesso promotore.

Inoltre, abbiamo effettuato come ulteriore controllo una quantificazione dei livelli del mRNA di CSB mediante l'utilizzo della tecnica di Real-Time PCR quantitativa (Figura 15-C). Questa analisi ci ha permesso di confermare che gli elevati livelli della proteina CSB sono dovuti ad un aumento della trascrizione del suo mRNA; tutte le linee cellulari tumorali analizzate, infatti, mostrano un aumento dei livelli di espressione del mRNA di CSB dalle tre alle cinque volte maggiore rispetto alle cellule normali.

Elevati livelli del mRNA di CSB sono stati, inoltre, rilevati andando ad analizzare diversi campioni di tessuti tumorali. Lo *screening* mediante Real-Time PCR quantitativa di un array contenente cDNA proveniente da vari tessuti tumorali e non (Tissue Scan Cancer qPCR Arrays Origine), di ghiandola mammaria, ovaio, polmone e rene, ha mostrato una up-regolazione del mRNA di CSB in quattro dei cinque campioni di cancro al polmone e al rene, mentre soltanto due dei cinque campioni di tessuto tumorale del seno e dell'ovaio mostrano un incremento dei livelli di espressione di CSB se comparati con i campioni di tessuto normale (Figura 15-D). L'eterogeneità dei livelli di espressione del mRNA di CSB tra i vari campioni di tessuti tumorali analizzati è comunque in linea con l'estesa eterogeneità genetica ed epigenetica che si riscontra tra i vari pazienti affetti da tumore.

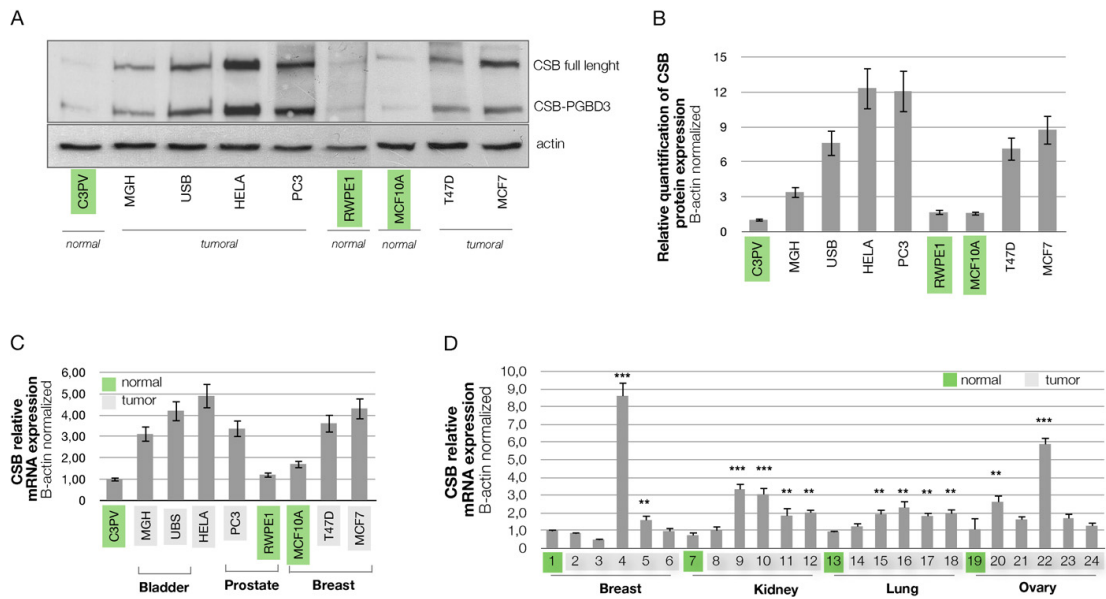


Figura 15 | Sovraespressione della proteina CSB in linee e tessuti tumorali. A) Analisi di Western Blot in cui sono mostrati i livelli di espressione delle proteine CSB full-length (forma wild type di CSB), CSB-PGBD3 (la forma della proteina CSB che subisce splicing alternativo con il trasposone PGBD3) e actina. L'actina è utilizzata come normalizzatore. L'analisi è stata condotta su 6 linee tumorali e su 3 linee di controllo normali (evidenziate in verde). Tutte le linee tumorali presentano elevati livelli della proteina CSB, se comparati con quelli presenti nelle linee di controllo normali. B) Quantificazione dei livelli di espressione della proteina CSB ottenuta tramite normalizzazione con le quantità di actina ottenute dall'analisi di Western Blot. C) Grafico che mostra i livelli del mRNA di CSB, analizzati mediante qRT-PCR. I livelli di mRNA di CSB sono stati normalizzati utilizzando il gene β -actina. I risultati sono stati ottenuti da tre esperimenti differenti. D) Risultati di un'analisi qRT-PCR di un array contenente cDNA proveniente da tessuti normali e a differenti stadi tumorali (Tissue Scan Cancer qPCR Arrays Origine). I livelli di CSB sono normalizzati con il gene β -actina. I simboli ** e *** indicano un valore di p -value < 0.01 e < 0.001 rispettivamente. Nel grafico sono mostrati i livelli del mRNA di CSB presente nei tessuti tumorali derivanti da ghiandola mammaria, ovaio, polmone e rene (grigio) e nei tessuti non tumorali (verde). Soprattutto nei tumori al seno e all'ovaio si riscontrano elevati livelli della proteina CSB. L'analisi è stata condotta in triplicato.

La concentrazione proteica di CSB è stata esaminata tramite una comparazione dei livelli di espressione della proteina nelle cellule tumorali (HeLa) e nelle cellule normali (C3PV) marcando contemporaneamente (sullo stesso vetrino) entrambe le linee con biglie fluorescenti di lattice (0,75 μm per le cellule HeLa e 2 μm per le cellule C3PV) e con un anticipo monoclonale per proteina CSB (Figura 16). L'analisi condotta al microscopio confocale ha messo in evidenza una significativa up-regolazione di CSB nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali.

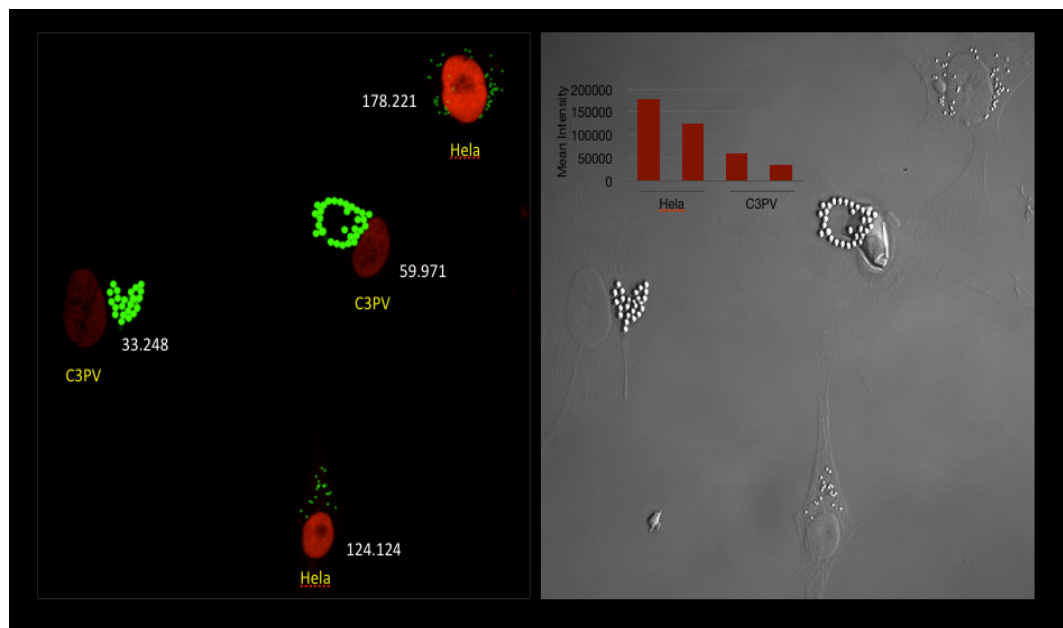


Figura 16 | Comparazione dei livelli di espressione della proteina CSB tra cellule HeLa e C3PV. Analisi effettuata al microscopio confocale della concentrazione di CSB in cellule normali (C3PV) e in cellule tumorali (HeLa) usando l'anticorpo che riconosce la proteina CSB (marcatura in rosso). Le cellule sono state pretrattate con delle biglie di lattice verdi fluorescenti di differenti dimensioni e seminate sullo stesso vetrino per l'analisi di espressione di CSB.

Infine, abbiamo analizzato i livelli di espressione del mRNA di CSB in diversi tessuti, fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), di pazienti affetti da cancro colon-rettale. Come si può vedere dal grafico in Figura 17, diversi pazienti sovraesprimono CSB nei loro tessuti tumorali rispetto al loro tessuto sano. Dei 18 pazienti analizzati, ben 12 mostrano elevati livelli di espressione del mRNA di CSB nei loro tessuti tumorali rispetto ai tessuti sani. Alcuni pazienti (6 dei 18 analizzati) mostrano una down regolazione dei livelli di espressione del mRNA di CSB; questo risultato potrebbe comunque essere in linea con l'eterogeneità genetica osservata tra i vari pazienti affetti da tumore.

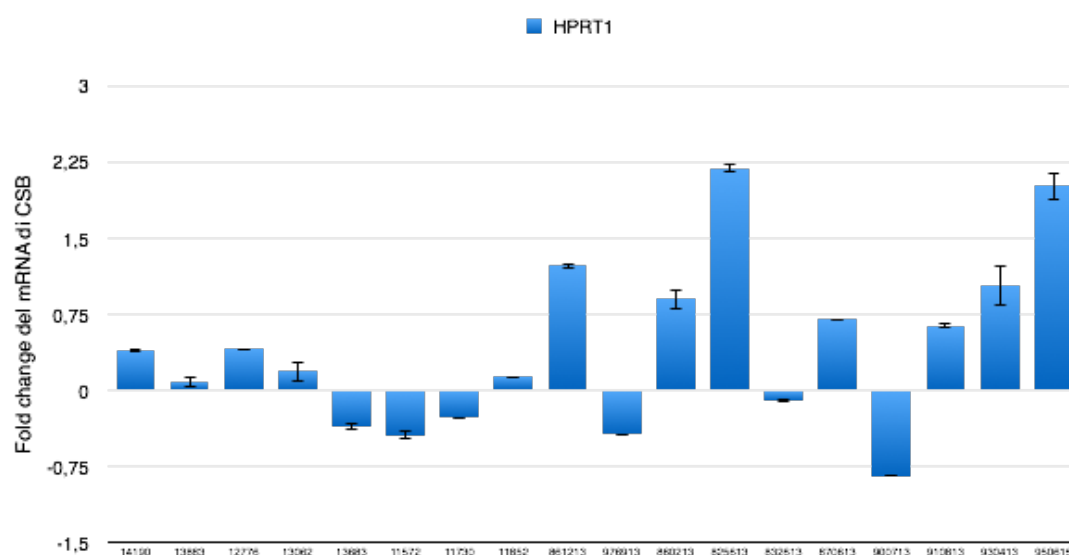


Figura 17 | Fold change dei livelli di espressione del mRNA di CSB in tessuti FFPE di cancro colon-rettale. Grafico che indica il fold change del mRNA di CSB, ottenuto mediante qRT PCR, di tessuti FFPE di pazienti affetti da cancro colon-rettale rispetto al loro tessuto sano. In ascissa sono indicati i numeri associati ai vari pazienti analizzati. L'esperimento è stato condotto in duplicato ed è stato utilizzato il gene HPRT1 come normalizzatore.

4.2 Inibizione della proteina CSB mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso

In precedenti studi, in parte condotti nel nostro laboratorio, è stato dimostrato che la proteina CSB modula negativamente l'apoptosi sia p53-dipendente che indipendente³⁷. Perciò ci siamo chiesti se la sovraespressione di CSB nelle cellule tumorali rendesse queste cellule più resistenti all'apoptosi.

Abbiamo deciso, quindi, di ridurre l'espressione di CSB e verificare se questo potesse rendere le cellule più sensibili all'apoptosi. Per inibire l'espressione di CSB, in maniera transiente, abbiamo progettato degli oligonucleotidi antisenso (ASO) in grado di bersagliare in vari punti il suo mRNA ed indurne la degradazione. Gli oligonucleotidi antisenso sono delle brevi sequenze di DNA che possono essere modificate chimicamente per diminuirne la degradazione intracellulare, basati sulla sequenza del mRNA che si desidera inibire³⁸; essi sono progettati in modo da ibridarsi a sequenze complementari di mRNA che codificano per le proteine bersaglio. Il legame dell'oligonucleotide al suo bersaglio si verifica seguendo regole altamente prevedibili e ben caratterizzate: l'appaiamento delle basi secondo Watson e Crick³⁹ (Figura 18).

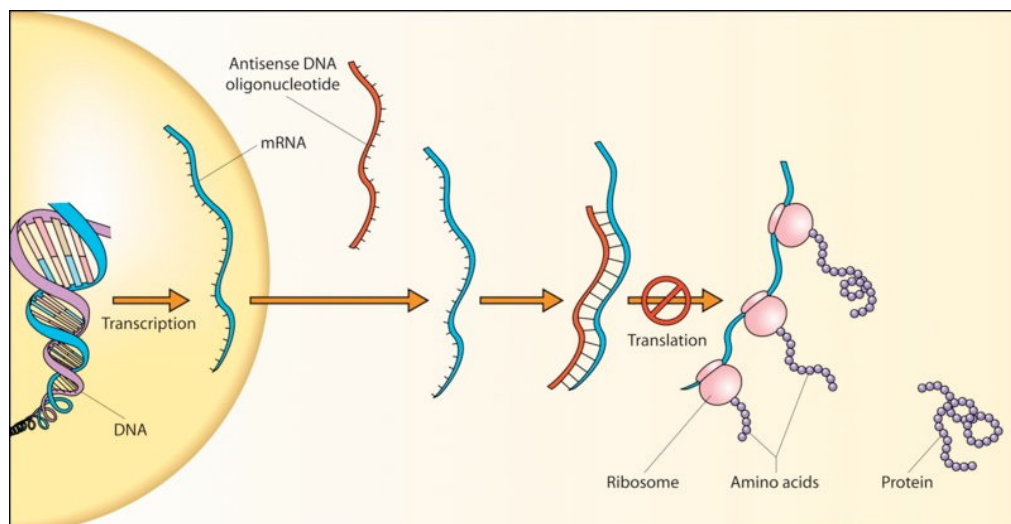
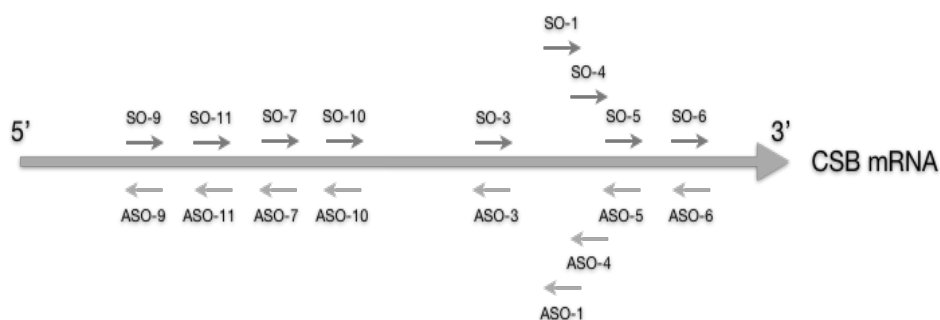


Figura 18 | Meccanismo di silenziamento ad opera di oligonucleotidi antisenso tramite inibizione della traduzione del mRNA. Il legame dell'oligonucleotide antisenso al mRNA bersaglio può bloccare il movimento dei ribosomi o il loro assemblaggio, arrestando la sintesi proteica.

Una volta che un oligonucleotide si è legato al suo mRNA bersaglio, diversi meccanismi possono portare all'inibizione dell'espressione della proteina codificata dal trascritto; tra questi il meccanismo che prevede l'attivazione della Rnasi H, un enzima in grado di degradare il filamento di RNA presente in un duplex RNA:DNA, o il meccanismo di arresto della traduzione, in quanto il duplex RNA:DNA può esso stesso bloccare il movimento dei ribosomi o il loro assemblaggio lungo l'mRNA^{40,41,42}.

La natura di questa inibizione dipenderà dalla chimica dell'oligonucleotide, dal sito della modificazione chimica all'interno dell'oligonucleotide stesso, e dalla localizzazione della sequenza bersaglio nell'mRNA verso cui è diretto. Per ciascun oligonucleotide *antisense* (ASO) è stato progettato anche il corrispettivo oligonucleotide *senso* (SO), il quale, avendo una sequenza identica al mRNA *target*, non completerà con esso⁴³. Le cellule trattate con gli oligonucleotidi senso sono state utilizzate come controlli ad ogni esperimento effettuato. Per i nostri studi sono state disegnate 9 diverse sequenze oligonucleotidiche antisense in grado di ibridare in differenti punti con l'mRNA della proteina CSB (Figura 19).



Oligonucleotide antisenso 1	5'-TCC TCC TCT TCC TCC TCC TCT- 3'
Ologonucleotide antisenso 3	5'-CTC CTC CTC CTC CTT CTC CT-3'
Oligonucleotide antisenso 4	5'-TCC TCC TCT TCC TCC TCC TC-3'
Oligonucleotide antisenso 5	5'-CTT CCT CCT CTT CCT CCT CCT-3'
Oligonucleotide antisenso 6	5'-TTT ATT ACA ACC TTG CTT C5'
Oligonucleotide antisenso 7	5'TAT CTC GTA AGA CAC ATG C-3'
Oligonucleotide antisenso 9	5'-TTC GAT TAG AGG TTA CTG C-3'
Oligonucleotide antisenso 10	5'-CTC CTC TTC CTC CTC CTC TGT-3'
Oligonucleotide antisenso 11	5'-GGA ACA TCA TGG TCT GCT CC-3'

Figura 19 | Oligonucleotidi sintetizzati ed utilizzati per silenziare la proteina CSB.
A) Schema rappresentante i vari oligonucleotidi antisenso e senso, sintetizzati ed utilizzati. Questo schema rappresenta l'mRNA di CSB ed i vari oligonucleotidi senso (SO) e antisenso (ASO) che sono stati disegnati basandosi sulla sequenza del mRNA di CSB. B) Tabella in cui sono indicate la varie sequenze oligonucleotidiche antisenso sintetizzate ed utilizzate per bersagliare la molecola di mRNA di CSB.

La capacità di ridurre l'espressione del gene bersaglio in cellule coltivate *in vitro* è fortemente potenziata da alcune sostanze capaci di favorire la cattura dell'oligonucleotide da parte delle cellule; a questo scopo, per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato micelle lipidiche cationiche (Oligofectamina, Invitrogen by Life Technologies) formulate specificatamente per permettere l'acquisizione di oligonucleotidi o siRNA da parte delle cellule eucariotiche. La figura 20-A mostra i livelli di espressione del mRNA di CSB in cellule HeLa, 12 ore dopo la trasfezione con i vari oligonucleotidi antisenso o senso (concentrazione finale di 200 nM). Gli oligonucleotidi antisenso più efficaci nell'inibire l'espressione di CSB si sono rivelati essere gli oligonucleotidi 7, 9 e 11, che hanno determinato rispettivamente una diminuzione del 65%, 82% e 70% dei livelli di espressione del mRNA di CSB (Figura 20-A).

4.3 La down-regolazione di CSB riduce la vitalità e la proliferazione delle cellule tumorali

In seguito abbiamo esaminato l'impatto della soppressione della proteina CSB sulla vitalità e sulla proliferazione nelle cellule HeLa. Per le nostre analisi sono stati utilizzati sia singoli oligonucleotidi sia combinazioni di due o tre ASOs (7, 9 e 11). I livelli di vitalità cellulari sono stati valutati 48h dopo la trasfezione mediante il saggio MTT. I risultati mostrati in Figura 20-C evidenziano una drammatica riduzione dei livelli di vitalità delle cellule HeLa quando l'espressione di CSB è ridotta mediante oligonucleotidi antisenso. In particolare, la combinazione 7+9+11 determina una riduzione di circa il 90 % dei livelli di vitalità cellulare rispetto ai campioni di controllo (cellule HeLa trasfettate con i rispettivi oligo senso). Inoltre, una trasfezione effettuata usando concentrazioni decrescenti di oligonucleotidi (7+9+11) ha dimostrato che la riduzione della vitalità cellulare è direttamente proporzionale al quantitativo di oligonucleotide antisenso utilizzato (Figura 20-D).

Per escludere l'eventualità che la riduzione di vitalità cellulare, in seguito al silenziamento, fosse correlata in qualche modo ad un effetto *off-target* anziché ad una down-regolazione di CSB, abbiamo riespresso CSB e valutato la capacità di ripristinare la vitalità delle cellule tumorali in cui avevamo silenziato geneticamente l'mRNA endogeno codificante per CSB. Per questo abbiamo trasfettato le cellule con

un vettore codificante per CSB contenente una sequenza di cDNA opportunamente mutagenizzata al fine di esprimere un mRNA che non può ibridarsi agli ASO utilizzati per il silenziamento genico del mRNA endogeno. Per minimizzare le sequenze di cDNA da mutagenizzare ci siamo concentrati sulla sequenza ASO11, poichè questo oligonucleotide ha un profondo effetto sulla down-regolazione di CSB e sulla vitalità quando è trasfettato da solo. Come mostrato in Figura 20-E, la riespressione di CSB esogeno salva le cellule tumorali dalla morte causata dal silenziamento genico del gene CSB endogeno.

In seguito, abbiamo effettuato un saggio MTT sulle altre linee cellulari che avevano mostrato una sovraespressione di CSB (MGH, USB, PC3, MCF7 e T47D), e abbiamo sostanzialmente confermato che la soppressione di CSB, anche in queste cellule, riduce drasticamente i livelli di vitalità cellulare (Figura 20-F).

In maniera non meno importante, abbiamo scoperto che nelle linee cellulari normali (C3PV, RWPE1 e MCF10A), che non sovraesprimono CSB, il silenziamento di questa proteina non inficia in alcun modo i livelli di vitalità cellulare (Figura 20-F). Al contempo, linee tumorali della ghiandola mammaria come ZR-75-1 e MDA-MB-2311, le quali non mostrano una sovraespressione di CSB, non riducono i livelli di vitalità cellulare quando vengono silenziate per CSB (dati non mostrati). Questo dato conferma il fatto che l'effetto deleterio sulla vitalità cellulare si ha solo nel caso in cui le cellule tumorali sovraesprimono CSB e dipendano strettamente dalla sua up-regolazione.

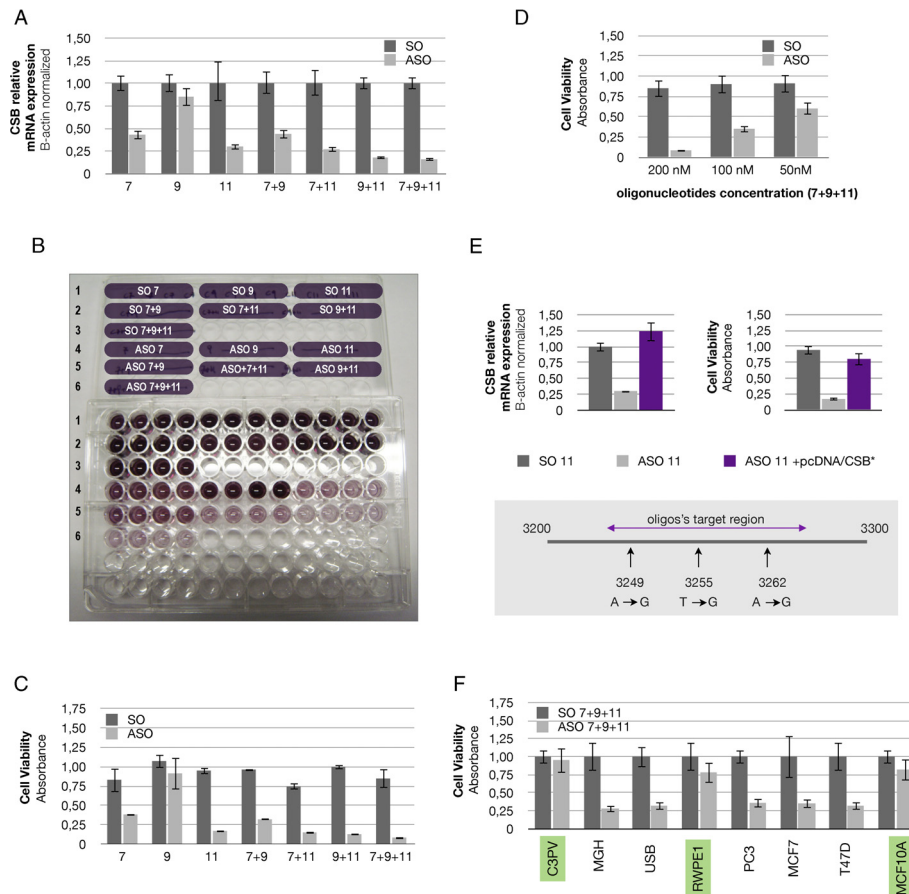


Figura 20 | Down-regolazione della proteina CSB e analisi della vitalità cellulare.
A) Analisi qRT-PCR effettuata per analizzare i livelli della proteina CSB 12h dopo la trasfezione. I risultati, normalizzati per il gene β -actina sono la media di tre differenti esperimenti. **B)** Piastra 96 well in cui è stato effettuato un saggio MTT, in cellule HeLa, usando sia vari oligonucleotidi senso (righe 1-3) che antisenso (righe 4-6). Le cellule HeLa sono state seminate, in quadruplicato, nei pozzetti della piastra 96 well, 18h dopo sono state trasfettate con gli oligonucleotidi senso o antisenso (concentrazione finale 200nM) e 48h dopo la trasfezione l'assorbanza relativa al MTT è stata misurata come discusso nel paragrafo Materiali e metodi. **G)** Grafico che illustra l'assorbanza relativa all'MTT test, mostrato nel pannello B, effettuato in cellule HeLa, 48h dopo la trasfezione; le cellule sono state trattate con la dose di 200 nM di oligonucleotidi senso o antisenso. In **D)** le cellule HeLa sono state trattate con una concentrazione decrescente di oligonucleotidi (combinazione 7+9+11) e l'analisi MTT è stata misurata 48h dopo la trasfezione. **E)** Grafici in cui sono mostrati i livelli di espressione del mRNA di CSB analizzati mediante qRT-PCR (12 ore dopo la trasfezione, pannello di sinistra) e i livelli di vitalità cellulare, analizzati mediante MTT test (48 ore dopo la trasfezione; pannello di destra), in cellule HeLa trattate con l'oligonucleotide senso o antisenso 11 (concentrazione finale 200 nm). Le colonne in viola rappresentano le cellule HeLa trasfettate con un vettore codificante per un cDNA che esprime un trascritto di CSB resistente alla degradazione da parte dell'ASO11. **F)** Grafico che mostra l'assorbanza di un MTT test effettuato in cellule normali (C3PV, RWPE1 e MCF 10A) e tumorali (MGH, USB, PC3, MCF7 e T47D) 48h dopo la trasfezione; le cellule sono state trattate con la concentrazione di 200 nM di oligonucleotidi senso o antisenso oligonucleotidi (combinazione 7+9 +11). I risultati illustrati sono una media dei valori ottenuti eseguendo l'analisi in triplicato.

Successivamente, abbiamo studiato i livelli di proliferazione cellulare tramite conta numerica effettuata a vari tempi dal silenziamento in cellule tumorali e non (Figura 21). In particolare, la conta cellulare è stata effettuata a 24, 48 e 72h dalla trasfezione con gli oligonucleotidi. L'inibizione della proteina CSB, effettuata con la combinazione oligonucleotidica 7+9+11, arresta completamente la proliferazione delle cellule HeLa per l'intero tempo dell'esperimento (*time course*); al contrario, non si ha nessun effetto sulla curva di proliferazione delle cellule HeLa trattate con la corrispettiva combinazione di oligo senso. Inoltre, mediante l'uso dello stesso *test* abbiamo analizzato i livelli di proliferazione delle altre linee tumorali, confermando che la soppressione di CSB riduce fortemente i livelli di proliferazione di tutte le linee tumorali caratterizzate dalla sua sovraespressione, ma non delle linee normali (Figura 21).

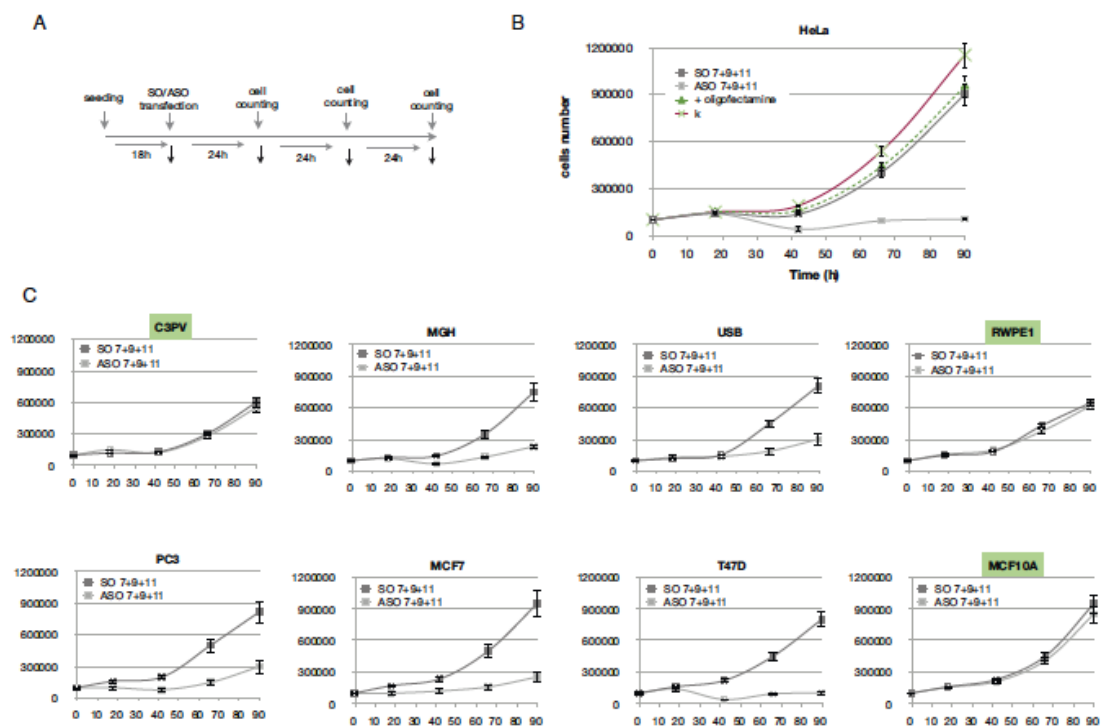


Figura 21 | Saggio di proliferazione cellulare. A) Schema dell'esperimento: sono state seminate 1×10^5 cellule in delle piastre 6 well e trasfettate, con la combinazione oligonucleotidica 7+9+11, 18h dopo la semina. Le cellule sono state contate al momento della trasfezione e 24, 48 e 72h dopo la trasfezione. L'analisi è stata fatta in triplicato. B e C) Grafici che mostrano i risultati del saggio di proliferazione effettuato in linee tumorali (HeLa, MGH, USB, PC3, MCF7 e T47D) e in linee normali (C3PV, RWPE1 e MCF10A).

L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante Citofluorimetria bivariata utilizzando una doppia marcatura del DNA, utilizzando lo Ioduro di Propidio e la Bromodeossiuridina (BrdU) (Figura 22). Questa analisi, molto più fine rispetto a quella monoparametrica, condotta solo utilizzando lo Ioduro di Propidio, permette uno studio del ciclo cellulare più accurato: infatti, con questa metodica si effettua una maggiore separazione delle cellule in fase S da quelle in fase tarda-G1 o inizio-G2. E' evidente che nei campioni trattati con gli oligonucleotidi antisenso è presente una popolazione sub-G1 apoptotica, una sostanziale scomparsa della popolazione G2 e un rallentamento o blocco della fase S, data la presenza di una popolazione con un contenuto di DNA intermedio tra la diploidia e la tetraploidia che però non ha incorporato BrdUrd (Figura 22).

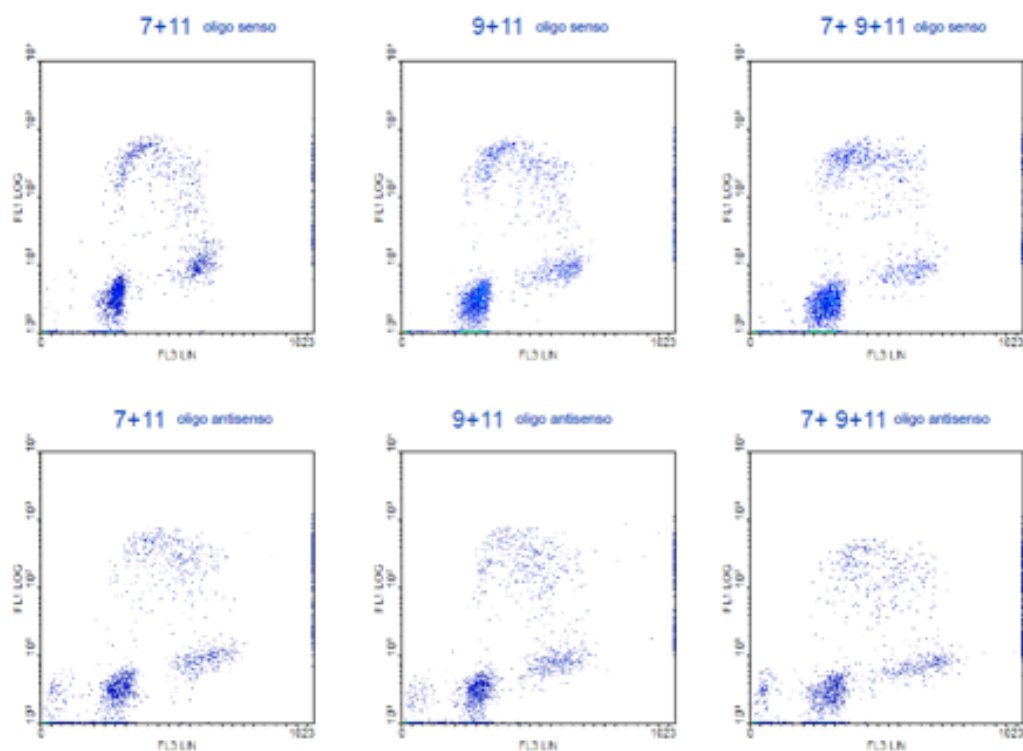


Figura 22 | Analisi del ciclo cellulare, tramite citofluorimetria bivariata, su cellule HeLa, 48h dalla trasfezione. Sono rappresentati gli istogrammi risultanti dall'analisi di cellule HeLa trattate, con differenti combinazioni oligonucleotidiche (7+11, 9+11 e 7+9+11). In ordinata è rappresentata la fluorescenza corrispondente alla Bromodeossiuridina, in scala logaritmica, mentre in ascissa è indicata la fluorescenza corrispondente allo Ioduro di Propidio, espressa in scala lineare.

Per valutare i livelli di apoptosi indotti a causa della soppressione di CSB abbiamo effettuato un saggio apoptotico di tipo morfologico che prevede l'utilizzo di tre coloranti fluorescenti (Fluoresceina Diacetato, Hoechst e Ioduro di Propidio) per analizzare le alterazioni morfologiche che le cellule subiscono durante questo processo di morte cellulare (Figura 23 A-C). La Fluoresceina Diacetato (FDA) e l'Hoechst (HO) marcano rispettivamente il citoplasma ed il nucleo cellulare delle cellule vitali; al contrario, le cellule necrotiche e le cellule apoptotiche negli stadi tardivi vengono marcate con lo Ioduro di Propidio (PI), che penetra e marca solo le cellule che hanno perso l'integrità della membrana citoplasmatica e nucleare. Come mostrato in Figura 23-A (pannello di sinistra), non sono presenti cellule apoptotiche in cellule HeLa trattate con l'oligo senso; infatti, tutte le cellule risultano vitali essendo marcate in verde con la Fluoresceina Diacetato. Invece, quasi tutte le cellule HeLa, silenziate per CSB, risultano in apoptosi o in necrosi in quanto hanno incorporato lo Ioduro di Propidio e sono marcate in rosso (Figura 23-A pannello di destra). Circa il 55% delle cellule silenziate per CSB risultano morte per apoptosi, contro il 5% delle cellule HeLa trasfettate con il corrispettivo oligo senso (Figura 23-B). Abbiamo esteso questa analisi alle altre linee cellulari, confermando che la soppressione di CSB aumenta in maniera drammatica l'apoptosi delle cellule tumorali ma non di quelle normali (Figura 23-C).

Infine, essendo CSB una proteina della riparazione del danno al DNA, ci siamo chiesti se il suo silenziamento rendesse più sensibili le cellule cancerose al trattamento con i convenzionali agenti chemioterapici. Abbiamo, quindi, combinato il silenziamento di CSB con la somministrazione di farmaci quali Oxaliplatino, Mitomicina-C e 5-Fluorouracile (Figura 23-D). I livelli di vitalità cellulare sono stati analizzati in seguito alla somministrazione di concentrazioni crescenti di oligonucleotidi antisense (50 e 100 nM) e di una concentrazione fissa dei tre agenti chemioterapici, corrispondere alla dose di IC₅₀ (dose di farmaco necessaria per ridurre del 50% i livelli di vitalità cellulare rispetto a delle cellule non trattate).

Il trattamento combinato ASO e agenti chemioterapici porta ad una maggiore riduzione della vitalità cellulare (effetto additivo) rispetto al trattamento con i soli ASO (comparare nel primo grafico, in Figura 23-D, i campioni 2 e 10 con il campione 6); mentre le cellule trattate con gli oligonucleotidi senso non mostrano una

riduzione dei livelli di vitalità cellulare né se utilizzati da soli né in combinazione con gli agenti chemioterapici. Le cellule normali C3PV non sono sensibili né al singolo trattamento (ASO o Oxaliplatino) né a quello combinato, almeno alle dosi utilizzate nelle cellule HeLa (Figura 23-E).

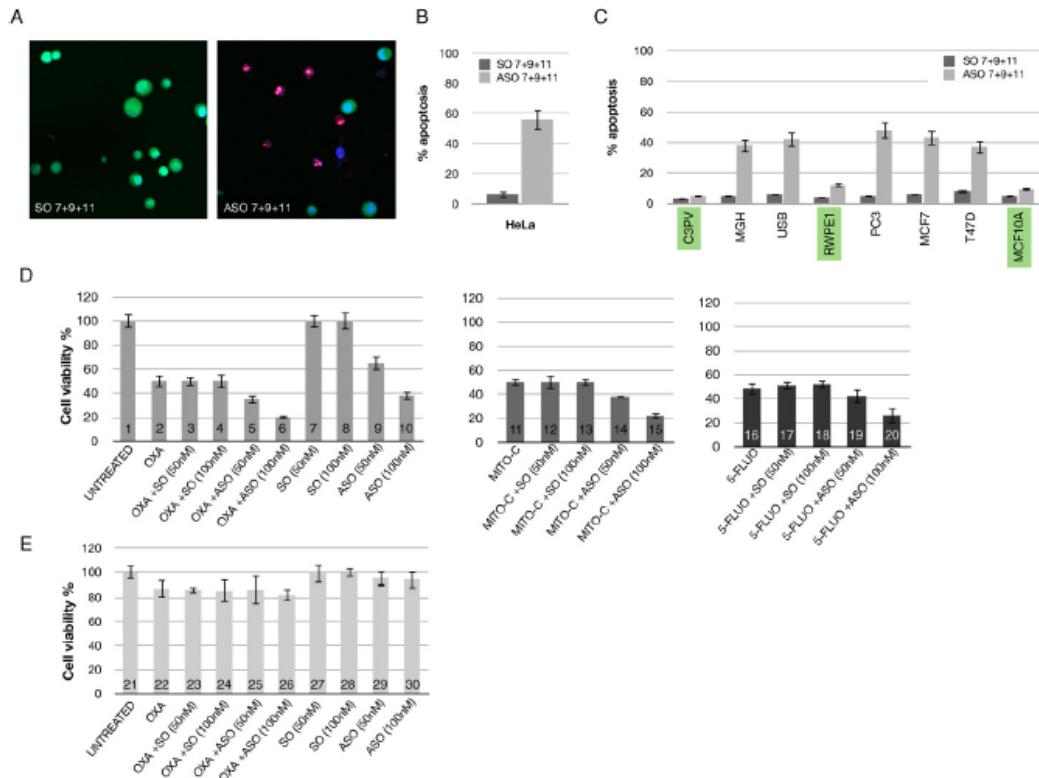


Figura 23 | Il silenziamento di CSB induce una massiccia morte delle cellule tumorali e sensibilizza queste cellule al trattamento con chemioterapici di tipo tradizionale. A) Immagini che mostrano la morte delle cellule HeLa in seguito al silenziamento di CSB in un saggio apoptotico di tipo morfologico. La morte cellulare è stata analizzata morfologicamente tramite marcatura con Fluoresceina Diacetato, Hoechst e Ioduro di Propidio. B-C) Percentuale di cellule apoptotiche presenti 48h dopo la trasfezione con gli oligonucleotidi senso o antisenso (combinazione oligonucleotidica 7+9+11) in cellule normali e tumorali. L'analisi, condotta sulla linea cellulare HeLa, è stata effettuata in duplicato. In ordinata è indicata la percentuale apoptotica, mentre, in ascissa gli oligonucleotidi o le combinazioni oligonucleotidiche utilizzate. D) Test MTT effettuato in cellule HeLa in cui è stato effettuato un trattamento combinato con oligonucleotidi senso (SO) o antisenso (ASO), a concentrazioni crescenti della combinazione 7+9+11, e con la dose IC50 di Oxaliplatino (0,55 M), Mitomicina-C (0,5 g/ml) o 5-Fluoruracile (3 g/ml). La dose di IC50 è stata calcolata precedentemente tramite MTT test. I risultati sono indicati come percentuale di vitalità relativa rispetto al controllo non trattato. Nel grafico sono mostrati anche i livelli di vitalità delle cellule HeLa trattate con i soli chemioterapici (IC50) E) MTT test effettuato in fibroblasti normali C3PV in cui è stato effettuato il trattamento combinato con Oxaliplatino (0,55 M) e una concentrazione crescente di oligonucleotidi antisenso (ASO) o senso (SO) 7+9+11.

4.4 Analisi di microarray

Al fine di comprendere il motivo che spinge le cellule tumorali ad overesprimere e a dipendere strettamente dall'espressione di CSB e di capire quali siano i cambiamenti d'espressione genica indotti nelle cellule tumorali in seguito al silenziamento di questa proteina, abbiamo deciso di effettuare un'analisi di microarray utilizzando estratti di mRNA provenienti da cellule HeLa silenziate in maniera transiente. L'estrazione del RNA totale proveniente da tre diversi controlli (campione non trattato, campione trattato con il solo trasfettante e campione trattato con trasfettante più oligonucleotide senso) e dalle cellule silenziate per CSB (trattate con trasfettante più oligonucleotide antisenso) è stata effettuata a 6 e a 12 h dalla trasfezione e l'RNA è stato sottoposto all'ibridazione su un Chip di microarray (Array Agilent SurePrint G3 8x60K). I dati sono stati generati da due esperimenti indipendenti (due trasfezioni). Come stabilito dal *clustering gerarchico* (Figura 24), i cambiamenti globali nei livelli di espressione genica tra i controlli e le cellule HeLa silenziate per CSB di due trasfezioni indipendenti sono molto simili, indicando una buona riproducibilità dei due insiemi di dati.

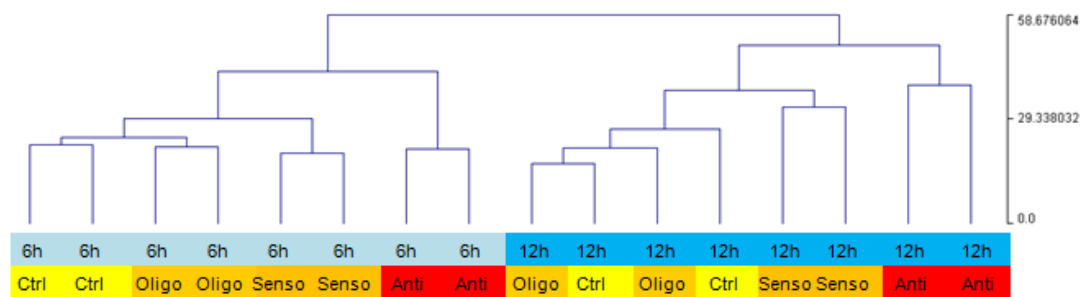


Figura 24 | Clustering gerarchico dell'analisi dei dati di microarray. Il clustering gerarchico è un algoritmo che permette di creare una "filogenesi" o gerarchia dell'espressione dei geni o dei profili genici dei campioni analizzati. I campioni in duplicato della nostra analisi di microarray clusterizzano vicini (soprattutto a 6h) e questo indica una buona riproducibilità dei due set di dati.

Prima del confronto tra i campioni silenzianti per CSB e i campioni di controllo, i dati sono stati filtrati per quei geni che hanno mostrato o una "chiamata assente" sul Chip (che suggerisce una mancata espressione del gene) o un valore di intensità basso (<100) tra tutti i campioni testati.

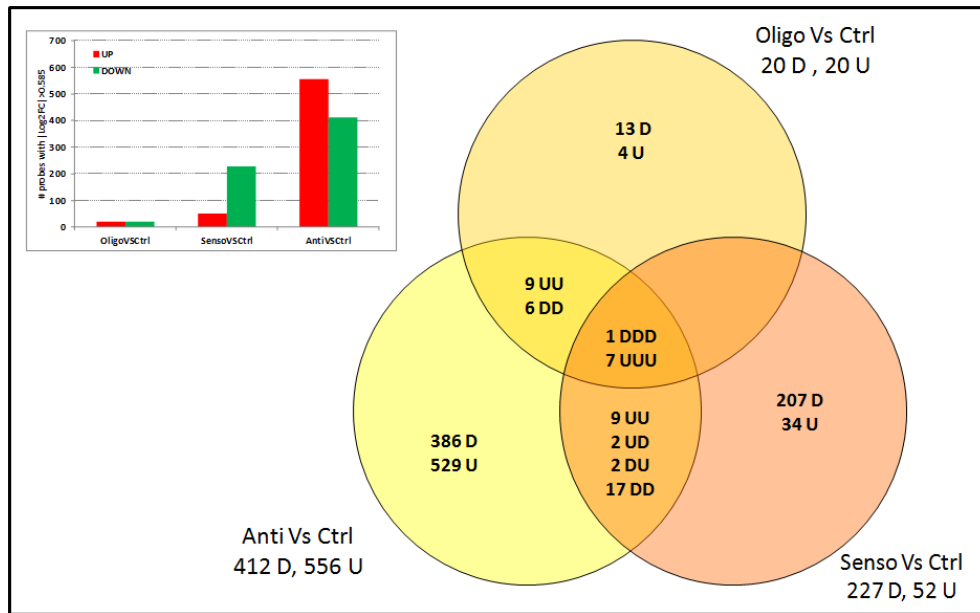


Figura 25 | **Risultati microarray 6 h dopo la trasfezione.** Nel diagramma di Venn è indicato il numero di geni down-regolati (D) e up-regolati (U) dei trattati con oligofectamina, senso e antisenso che mostrano un valore di $|\text{Log}_2\text{FC}| > 0,585$ rispetto al controllo, 6 h dopo la trasfezione. Nelle intersezioni l'ordine delle lettere segue il senso orario del diagramma.

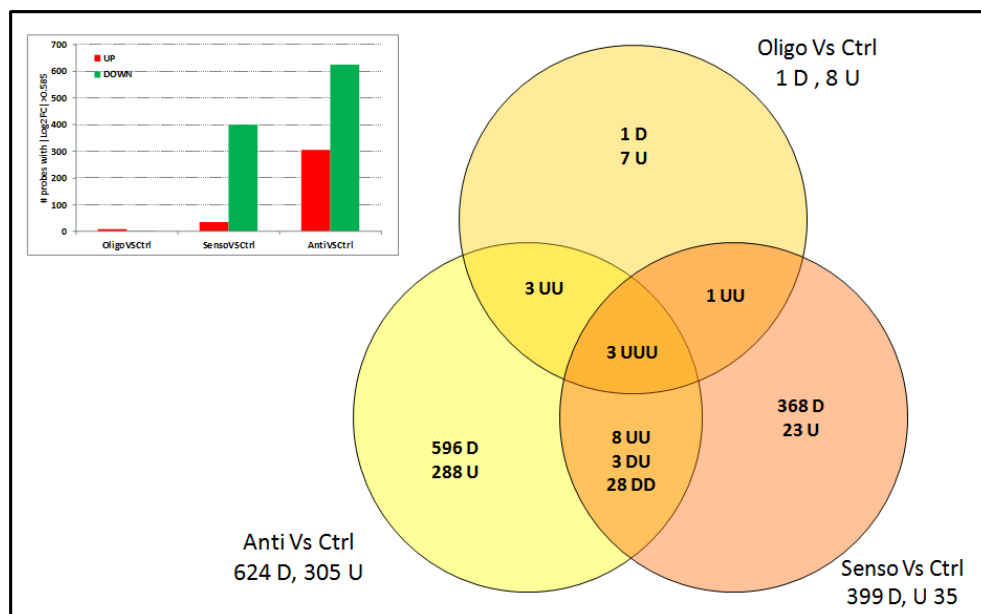


Figura 26 | **Risultati microarray 12 h dopo la trasfezione.** Nel diagramma di Venn è indicato il numero di geni down- (D) e up-regolati (U) dei trattati con oligofectamina, senso e antisenso che mostrano un valore di $|\text{Log}_2\text{FC}| > 0,585$ rispetto al controllo, 12 h dopo la trasfezione. Nelle intersezioni l'ordine delle lettere segue il senso orario del diagramma.

Un ulteriore *screening* dei geni up- e down-regolati nel campione silenziato è stato effettuato andando a selezionare i geni la cui espressione mostrava un valore di *Fold Change* superiore a 2 ($\text{Log2FC} > 1$) per i geni up-regolati e inferiore a 0,5 ($\text{Log2FC} < -1$) per i geni down-regolati rispetto ai vari controlli (Figure 25 e 26). Basandoci su questi criteri, abbiamo selezionato 69 geni *up-regolati* e 144 geni *down-regolati* nelle cellule HeLa silenziate per CSB 6h dopo la trasfezione. L'analisi è proseguita con la classificazione funzionale dei geni up- e down-regolati attraverso la consultazione del *data-base Gene Ontology* e la ricerca in letteratura. Abbiamo focalizzato, per ora, il nostro interesse sui geni la cui espressione varia nell'arco di 6 h dalla trasfezione e la cui funzione è correlata con quella di altri geni o in generale con il processo apoptotico. Da questo ulteriore *screening* l'attenzione si è ristretta a 18 *down-regolati* (Tabella 1) e 22 geni *up-regolati* (Tabella 2).

Tabella 1 | *Classificazione funzionale dei geni down-regolati 6h dopo la trasfezione nelle cellule HeLa silenziate rispetto ai controlli.*

<u>Gene</u>	<u>Funzione</u>
RBM25	Proteina legante l'RNA. Regola lo splicing alternativo. Coinvolto nell'apoptosi attraverso la regolazione di BCL2L1.
CIQBP	Componente del complemento. Identificata anche come subunità p32 del fattore di splicing SF2.
TCP1	Chaperon molecolare. Assiste il processo di folding proteico in maniera ATP-dipendente.
ERGIC2	Possibile ruolo nel trasporto tra reticolo endoplasmatico e Golgi.
ST13	Proteina adattatrice che media l'associazione delle Hsp70 e Hsp90 con il substrato proteico.
RPS17	Proteina ribosomiale, componente della subunità del ribosoma 40S.
CWC22	Richiesta per lo splicing del pre-mRNA.
PSMD6	Agisce come subunità regolatoria del proteasoma 26S, che è coinvolto nella degradazione ATP-dipendente di proteine ubiquitinate.
KIF1C	Proteina richiesta per il trasporto retrogrado delle vescicole del Golgi al reticolo endoplasmatico.
RAB13	Riveste un ruolo nel regolare il traffico vescicolare tra Golgi e endosomi.
HSPA4	Heat shock protein. Proteina di risposta a condizioni di <i>stress</i> , quali ER <i>stress</i> .
TRAPPC3	Coinvolta nella regolazione del trasporto dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi.
HSPA1A	Heat shock protein. Proteina di risposta a condizioni di <i>stress</i> , quali ER <i>stress</i> .
SELK	Selenoproteina localizzata sul reticolo endoplasmatico. Coinvolta nell'ERAD di proteine glicosilate.
DDX39B	Coinvolta nell'export nucleare di <i>spliced</i> e <i>unspliced</i> mRNA.
HSPD1	Heat shock protein. Proteina di risposta a condizioni di <i>stress</i> , quali ER <i>stress</i> .
SACS	Co-chaperon che agisce come regolatore della Hsp70.
STX8	Regola il traffico vescicolare, mediando il trasporto retrogrado dall'apparato di Golgi al reticolo endoplasmatico.

Tabella 2 | *Classificazione funzionale dei geni up-regolati 6h dopo la trasfezione nelle cellule HeLa silenziate rispetto ai controlli.*

<u>Gene</u>	<u>Funzione</u>
ATF3	Gene proapoptotico attivato in seguito a ER <i>stress</i> .
CHOP	Fattore di trascrizione che induce arresto del ciclo cellulare e apoptosi in seguito a ER <i>stress</i> .
CHAC1	Proteina proapoptotica appartenente al pathway UPR. Fa parte della cascata ATF4-ATF3-CHOP.
INHBA	Regola negativamente la proliferazione delle cellule stromali delle gonadi.
PPP1R15A	Gene indotto in seguito a <i>stress</i> , gioca un ruolo nel recupero della traduzione durante l'ER <i>stress</i> . È coinvolto anche nell'apoptosi.
SESN2	Coinvolto nell'ER <i>stress</i> e nell'induzione dell'autofagia.
BBC3	È regolato da CHOP. Induce la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e l'apoptosi.
FOSB	Implicato nell'induzione dell'apoptosi in risposta a condizioni di <i>stress</i> .
TRIB3	Indotto in seguito a ER <i>stress</i> dal pathway ATF4-CHOP. È coinvolto nella morte cellulare.
JUN	L'up-regolazione di questa proteina inibisce la proliferazione e induce apoptosi.
KLF6	Sopprime la crescita tumorale e induce apoptosi nelle cellule tumorali attraverso l'espressione di ATF3.
KLF4	La sua over-espressione è associata con l'inibizione della proliferazione cellulare, l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi.
GADD45A	È indotto da ATF4, media l'apoptosi indotta da ER <i>stress</i> .
ASNS	Gene pro-apoptotico indotto da ATF4 durante l'ER <i>stress</i> .
JUND	Implicato nell'induzione dell'apoptosi in risposta a condizioni di <i>stress</i> .
NUPR1	Coinvolto nell'apoptosi attraverso l'up-regolazione di geni come ATF4, CHOP e TRIB3.
AEN	Esonucleasi con attività sia sul DNA, sia sull'RNA. Media l'apoptosi indotta da p53.
KLF10	Coinvolto nell'inibizione della proliferazione cellulare e nell'induzione dell'apoptosi.
IER3	Glicoproteina che regola l'apoptosi indotta da recettori di morte. La sua espressione aumenta rapidamente in risposta a diversi <i>stress</i> cellulari.
PMAIP1	Promuove l'apoptosi attraverso l'attivazione di caspasi.
BTG1	La sua espressione aumenta in cellule apoptotiche.

Dall'analisi dei geni differenzialmente espressi, nelle cellule HeLa silenziate rispetto ai vari controlli, abbiamo scoperto che molti dei geni up-regolati sono geni che normalmente vengono indotti in seguito all'attivazione del *pathway* UPR (Unfolded Protein Response), una risposta adattativa che le cellule attuano quando si accumulano proteine *misfolded* o *unfolded* nel reticolo endoplasmatico, una condizione nota come *stress del reticolo endoplasmatico* (ER stress)⁴⁴; in particolare tutti i geni che abbiamo trovato sovraespressi nella nostra analisi sono sotto il controllo del fattore trascrizionale ATF4, un importante mediatore del *pathway* UPR, e fanno parte della cascata di segnalazione indotta in seguito a ER *stress* (il *pathway* UPR e l'ER *stress* saranno meglio descritti nel BOX 1). Infatti, diversi geni indotti in seguito a ER *stress* da ATF4⁴⁵ quali ATF3, Gadd45a, NOXA, CHAC1 e CHOP sono stati trovati up-regolati nelle cellule HeLa silenziate per CSB. CHOP, che è fortemente indotto in risposta allo stress del reticolo endoplasmatico, e mostra una up-regolazione di 6,73 volte superiore nelle cellule silenziate per CSB rispetto alle cellule di controllo non trattate. CHOP attiva la trascrizione di numerosi geni che potrebbero potenziare il processo apoptotico^{44,45} (BOX 1). Questi includono Gadd34, Trib3 e PUMA (BBC3), geni che abbiamo trovato up-regolati nelle cellule silenziate per CSB (rispettivamente 4,63, 3,86 e 3,78 volte maggiore). I nostri dati di microarray dimostrano, quindi, che le cellule tumorali silenziate per CSB mostrano una up-regolazione di diversi geni apoptotici coinvolti nella risposta UPR, quali PUMA, NOXA e TRIB3.

I geni down-regolati appartengono, invece, a tre grandi categorie funzionali: trasporto vescicolare tra Golgi e Reticolo Endoplasmatico (es. ERGIC2, KIF1C e RAB13), meccanismo di splicing (es. RBM25, C1QBP e CWC22) e folding proteico (es. ST13, HSPA4 e HSPA1A). Questi geni possono essere indirettamente collegati con l'ER stress, in quanto un'alterazione dei processi in cui sono coinvolti, soprattutto splicing e folding proteico, può essere causa di ER *stress*^{46,47}. Tutto questo si applica non solo alle cellule normali, ma anche a quelle cancerose. L'analisi dei geni up- e down regolati suggerisce che nelle cellule HeLa silenziate per CSB, una persistente condizione di ER *stress*, induce l'apoptosi piuttosto che una risposta adattiva.

Il reticolo endoplasmatico (ER) è un organello che svolge un ruolo preminente in numerosi processi di fondamentale importanza per la sopravvivenza e per il normale funzionamento cellulare.

Il reticolo endoplasmatico è responsabile dell'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} , della biosintesi dei lipidi, del trasporto, del ripiegamento (*folding*) e delle modifiche post-traduzionali di proteine di membrana e secrete⁴⁸.

Il processo di *folding* proteico che avviene all'interno dell'ER è estremamente sensibile a cambiamenti ambientali, quali alterazioni nei livelli di Ca^{2+} , condizioni redox, stato dei nutrienti, incremento nel tasso di sintesi proteica, presenza di patogeni o stimoli infiammatori. Tali stimoli possono alterare il meccanismo di *folding* delle proteine, causando l'accumulo di proteine *unfolded* e *misfolded*, una condizione chiamata *ER stress*. L'esito dell'attivazione dell'UPR è l'attenuazione della sintesi proteica, l'aumento della capacità di traffico proteico attraverso l'ER, il trasporto e il *folding* delle proteine, e l'attivazione di diversi *pathway* volti alla loro degradazione, inclusi la *degradazione associata a ER* (ERAD, ER-Associated Degradation) e l'autofagia. Se questi meccanismi non riescono a risolvere il difetto nel *folding* proteico, le cellule vanno incontro all'apoptosi⁴⁹. Tutto questo si applica non solo alle cellule normali, ma anche a quelle tumorali.

Tre vie di segnalazione possono essere attivate in seguito a ER stress (Figura 1):

- PERK (PRKR-like ER kinase) – eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2)
- IRE1 α (inositol-requiring protein 1 α) – XBP1 (X-box binding protein 1)
- ATF6 α (activating transcription factor 6 α)

La protein chinasi PERK, attivata, fosforila il fattore eIF2 α (una subunità del complesso eterotrimerico eIF2) a livello della Serina 51⁵⁰. Questo porta ad una attenuazione del processo di traduzione, dovuta alle quantità limitanti del complesso ternario eIF2-GTP-tRNA_{met}. Il blocco della sintesi proteica, paradossalmente, incrementa la traduzione di diversi mRNA, tra i quali quelli codificanti per ATF4, ATF5⁵¹ e alcuni trasportatori aminoacidici⁵². ATF4 è un fattore di trascrizione che, una volta sintetizzato, entra nel nucleo per attivare geni di risposta all'ER stress, responsabili della risposta antiossidante e del trasporto e della biosintesi degli aminoacidi, per promuovere la sopravvivenza cellulare⁵². Uno dei geni attivati trascrizionalmente da ATF4 è GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*, anche conosciuto come PPP1R15A), il cui prodotto media la defosforilazione di eIF2 α , in modo da restaurare, attraverso un meccanismo a *feedback* negativo, il normale processo di traduzione. ATF4 attiva anche la trascrizione di CHOP (*C/EBP homologous protein*)^{52,53}, che è richiesta per l'apoptosi ER stress-mediata sia *in vitro* che *in vivo*^{54,55}.

Invece, l'endonucleasi IRE1 α attivata agisce specificatamente sull'mRNA *unspliced* del fattore di trascrizione XBP1 (x-box binding protein 1), presente nel citosol e trascritto da ATF6, effettuando un meccanismo di *splicing* non convenzionale^{56,57}. L'mRNA sXBP1 dà luogo ad una proteina differente rispetto alla uXBP1, a fronte del *frameshift* a livello del codice genetico che si verifica durante il processo di traduzione. La proteina sXBP1, agendo come fattore di trascrizione, entra nel nucleo e va ad attivare diversi geni *target*⁵⁸. I geni che sono regolati dal *pathway* IRE1 α -XBP1 incrementano il *folding*, il traffico e l'ERAD delle proteine, tentando di risolvere così il *misfolding* proteico^{59,60}. L'espressione di sXBP1, inoltre, inibisce l'espressione di CHOP, promuovendo la sopravvivenza cellulare⁶¹.

Infine, la proteina ATF6 attivata migra verso l'apparato di Golgi attraverso un trasporto vescicolare. Nell'apparato di Golgi, ATF6 subisce due tagli proteolitici in un processo che va sotto il nome di *proteolisi intramembrana regolata* o RIP⁶². La porzione citosolica che viene rilasciata in seguito al taglio proteolitico agisce da fattore di trascrizione attivo⁶³ e trasloca nel nucleo, dove induce la trascrizione di geni che possiedono a livello del proprio promotore un *ER response element* (ERSE)⁶⁴.

I geni *target* regolati da ATF6 includono quelli codificanti per alcuni *chaperon*, come ad esempio BiP e GRP94, per proteine disolfuro isomerasi (PDI), per i fattori di trascrizione CHOP e XBP1⁵⁷.

Poiché l'attivazione di ATF6 determina l'induzione dell'espressione di geni codificanti per proteine *chaperon*, la sua attivazione è responsabile dell'aumento della capacità del reticolo di ripiegare le proteine, contribuendo al ripristino dell'omeostasi iniziale.

L'accumulo di proteine *unfolded* nel reticolo endoplasmatico è un evento tossico per le cellule. Per questo, se i pathway PERK, ATF6 e IRE1 non riescono a sopprimere ER stress, all'interno della cellula viene innescato un meccanismo di apoptosi per assicurare la sopravvivenza dell'organismo. Diversi *pathway* sono coinvolti nell'apoptosi indotta da ER-stress. La completa induzione della morte cellulare sembra richiedere la concomitante attivazione di diverse vie.

Uno dei principali *pathway* coinvolti nell'induzione dell'apoptosi è quello mediato dalla proteina CHOP. CHOP è un fattore di trascrizione di 29 kDa, facente parte della famiglia delle *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP). L'espressione di CHOP è indotta dai pathway ATF6 e PERK in seguito a ER-stress^{65,66,67}.

Numerosi studi sperimentali, condotti allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari che stanno alla base dell'apoptosi mediata dall'induzione di CHOP, hanno permesso di identificare diversi suoi geni *target*. Tra questi, per esempio, troviamo GADD34 e BCL-2. Il gene GADD34, codifica per una proteina che ha il compito di ripristinare la sintesi proteica all'interno della cellula⁶⁸. Il meccanismo attraverso il quale GADD34 promuove l'apoptosi è sconosciuto, anche se esistono diverse teorie al riguardo. A tal proposito, alcuni autori sostengono che l'induzione di GADD34 permettendo la riattivazione del processo di traduzione bloccata in seguito a ER stress, favorirebbe la sintesi di proteine pro-apoptotiche⁶⁹.

Evidenze recenti suggeriscono che, inoltre, CHOP è in grado di promuovere l'apoptosi reprimendo l'espressione di BCL2⁷⁰, aumentando la trascrizione di BIM (*BCL-2 interacting mediator of cell death*, anche conosciuto come BCL2L11)⁷¹ e promuovendo la traslocazione di BAX a livello dei mitocondri⁷². È stato inoltre dimostrato che CHOP si lega direttamente e induce i promotori di PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*, anche conosciuto come BBC3)⁷³, LCN2 (*lipocalin 2*)⁷⁴.

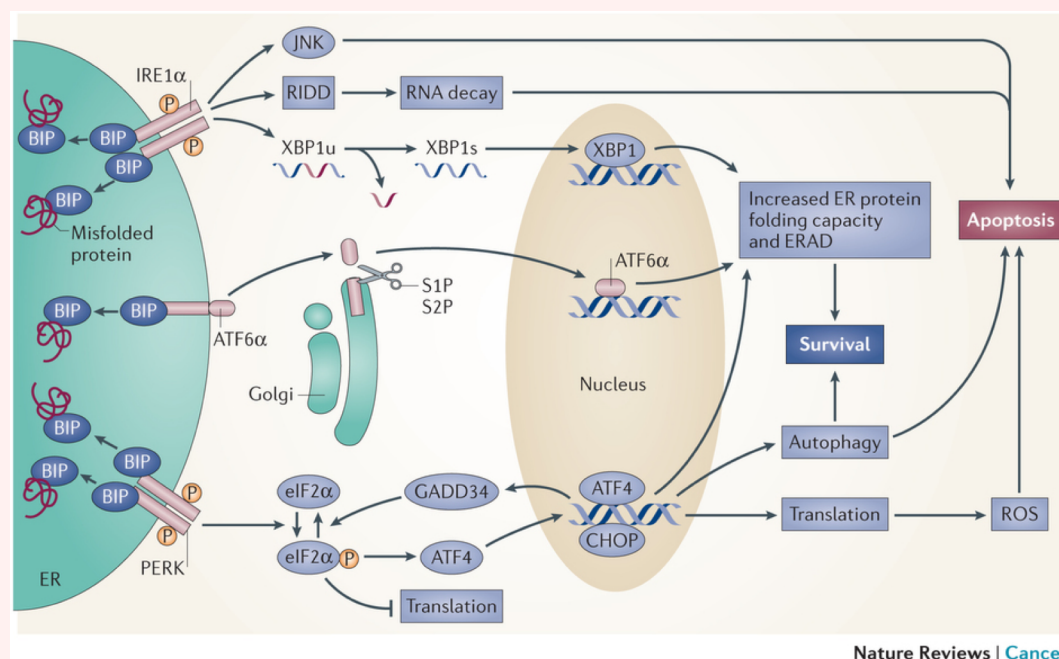


Figura 1 | Pathway di segnalazione UPR. In seguito a ER stress, le proteine unfolded e misfolded legano e sequestrano BiP, attivando così il pathway UPR. L'UPR comprende tre vie di segnalazione parallele: PERK – eIF2α, IRE1α – XBP1 e ATF6. L'esito dell'UPR è l'incremento del folding proteico, il trasporto e la degradazione delle proteine (ERAD), l'attenuazione della sintesi proteica. Se il misfolding proteico non viene risolto, le cellule vanno incontro al processo apoptotico.

Il passo successivo è stato andare a ricercare, tramite il *tool* Genomatix, possibili fattori di trascrizione che potessero legare i promotori di questi geni, ponendo particolare attenzione a quei fattori di trascrizione che risultavano essere in comune tra più geni (Tabelle 3 e 4); questo al fine di comprendere se a monte di questi geni differenzialmente espressi ci fosse un meccanismo di regolazione comune, e se in questo meccanismo fosse coinvolta la proteina CSB.

Per confermare i dati ottenuti con la tecnica dei microarray, abbiamo effettuato un'analisi di qRT-PCR utilizzando mRNA estratto dai vari controlli e dal campione silenziato, utilizzando i geni β -actina (ACTB) e HPRT1 come normalizzatori. I risultati sono mostrati nelle Figure 27, 28, 29 e 30.

Nelle tabelle sono comparati i valori di *fold change* ottenuti dalle analisi di microarray e qRT-PCR dei geni up- (Tabella 5) e down-regolati (Tabella 6) nelle cellule HeLa silenziate per CSB rispetto al controllo. Come è possibile notare, c'è un'elevata corrispondenza nei valori ottenuti dalle due diverse analisi.

Tabella 3 | In tabella sono mostrati i fattori di trascrizione la cui sequenza consenso è stata ritrovata in più del 75% dei geni up-regolati. L'intensità del colore delle celle è inversamente proporzionale al numero di sequenze consenso trovate dal tool genomatix nel promotore del gene corrispondente. Analisi effettuata sui promotori dei geni up-regolati.

TF	ATF3	CHAC1	INHBA	PPP1R15A	SES2	BBC3	FOSB	TRIB3	GDF15	JUN	KLF6	KLF4	GADD45A	ASNS	JUND	NUPR1	AEN1	KLF10	IER3	NOXA	BTG1
AHRARNT	3	1		5	1	2	1	1	1	1	4	1	2	1	2			2	2	1	1
CTCF	5	9			4	11	6	1	1	14	8	4	3		9	1	2	7	2	5	6
E2F	2	1		2	3	2	5	1	1	2	1	3	2	1	3		1	2	3	1	1
EGR1	8	1	1		2	9	4	1	1	9	6	11	3	2	10		2	8	2	2	1
GCM1	3	2	2		1	2	3	3	2	5	3	1	1	3	5	1	2	2	1		4
GKLF	1	1	1	3		1	1	5	1	1		4		1	1	3	4	3	2	3	
NM23	6	1	1	2	2	9	4	1	2	4	3	8	2		10			11	1	7	4
OCT1	2	1	7	3	3	1	5	1	1	2	1		4	5	1	5		1	1	5	
PAX6	2		3	2	1	2	2	2	3	1	2	1	2	2		1	1	2	1	2	5
PPARG	1	2		2	1	2	2		3	1	1		3	1	2		1	3	2	2	1
SP1	4	2			1	10	5	1	1	8	9	6	2	2	11		1	9	1	4	2
VDR_RXR	4	1	2	3	5	1	2	4	5	4	3	3	1		3	2	2	4		2	1
XCPE1	1	2			1	4	3	1	2	5	4	1	3		7	2	2	3	1	4	3
ZBTB7	4	2	2		1	6	4		3	7	3	6		1	4	1	1	7	2	4	
ZF5		4		2	1	7	16	4	2	2	15	10	5		12		1	9	1	3	4

Tabella 4 | In tabella sono mostrati i fattori di trascrizione la cui sequenza consenso è stata ritrovata in più del 75% dei geni down-regolati. L'intensità del colore delle celle è inversamente proporzionale al numero di sequenze consenso trovate dal tool genomatix nel promotore del gene corrispondente. Analisi effettuata sui promotori dei geni down-regolati.

TF	RBM25	C1QBP	TCP1	ERGIC2	ST13	RPS17	CWC22	PSMD6	KIF1C	RAB13	HSPA4	TRAPPC3	HSPA1A	SELK	DDX39B	HSPD1	SACS	STX8
BCL6	4	2	4	2	2		2	2	1	1	2	3	1	3		3	1	2
BRN5	5	2	1	8	1	2	3	6		1	1	2		1	4		2	9
E2F	5	2	4	2	1	3	2		1	1	2	2	3	1	1	3	3	2
GCM1	1	1	1			3		2	4	2	6	1	4	1	1	1	3	2
HMX2	3	2	3	2	1		3	3	1	3		3	2	2	5	3	4	1
HSF1	2	2	3	1	4	2	2		1	2	3	1	9	4	2	5	4	1
HSF2	1	5	3		4	2	1	1	1		1		4	3	2	6	3	1
MYT1	1	1	1	3		1	5	1	1	2	2	2	1	5	1	2		2
NFAT5	2	1	2		1		4	3	1	1		1	4	3	2	3	2	1
NKX25	4		1	3	1	1	1	2		1	1		2	2	1	1	2	1
PAX6	1	1		2	3	1	3	2	3	1	2	1	1	1	1	2	4	3
SRF	5	4	4	1	2	1		1	2	3	2	4	3	4	1		3	1
VDR_RXR	2	2	3	1	3	1	1	1	3	4	1	2	4	2	1		1	

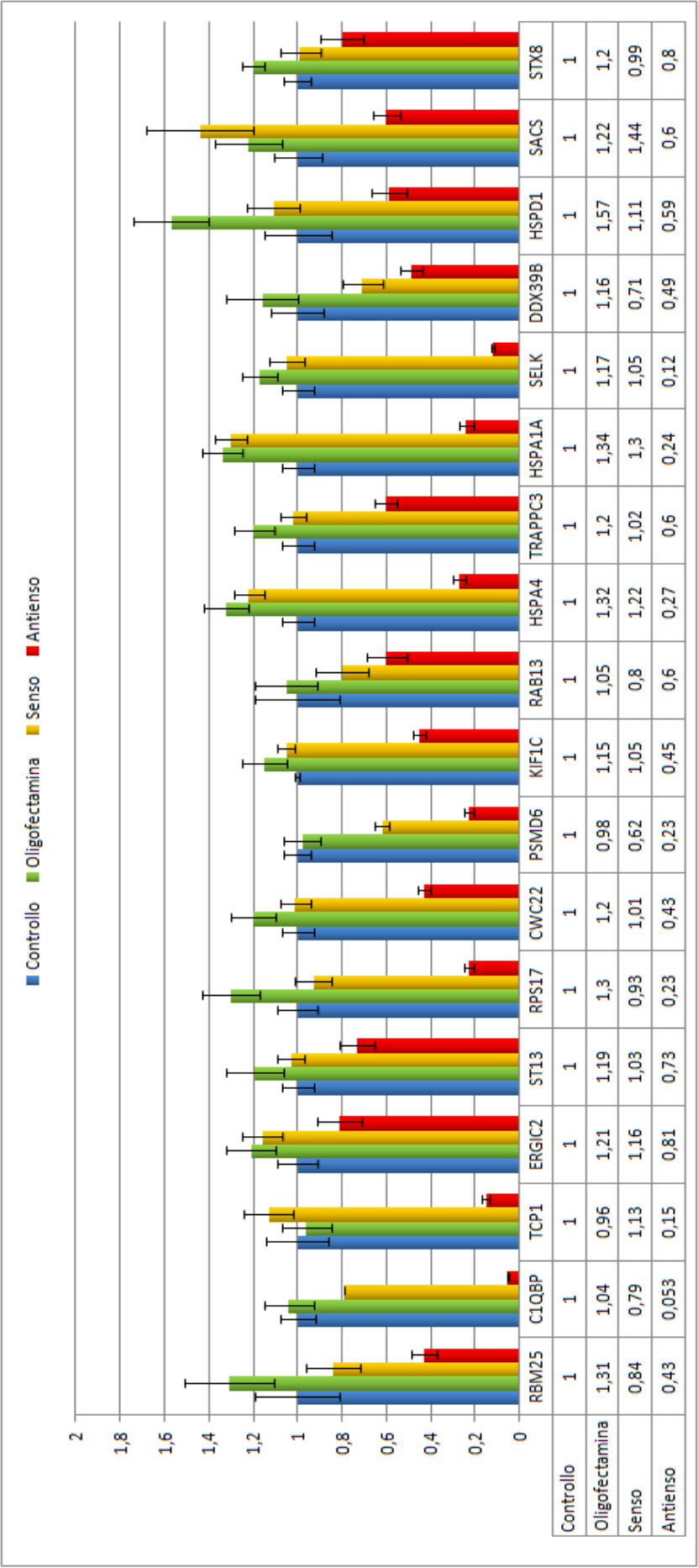


Figura 27 | Risultati di qRT-PCR dei geni down-regolati 6h dopo la trasfezione. Il grafico mostra i livelli di espressione, analizzati tramite qRT-PCR, del mRNA dei geni trovati down-regolati nell'analisi di microarray nelle cellule HeLa trattate con oligofectamina (verde), oligofectamina + oligonucleotide senso (giallo) e oligofectamina + oligonucleotide antisense (rosso) rispetto al controllo (blu). La normalizzazione è stata effettuata con il gene ACTB.

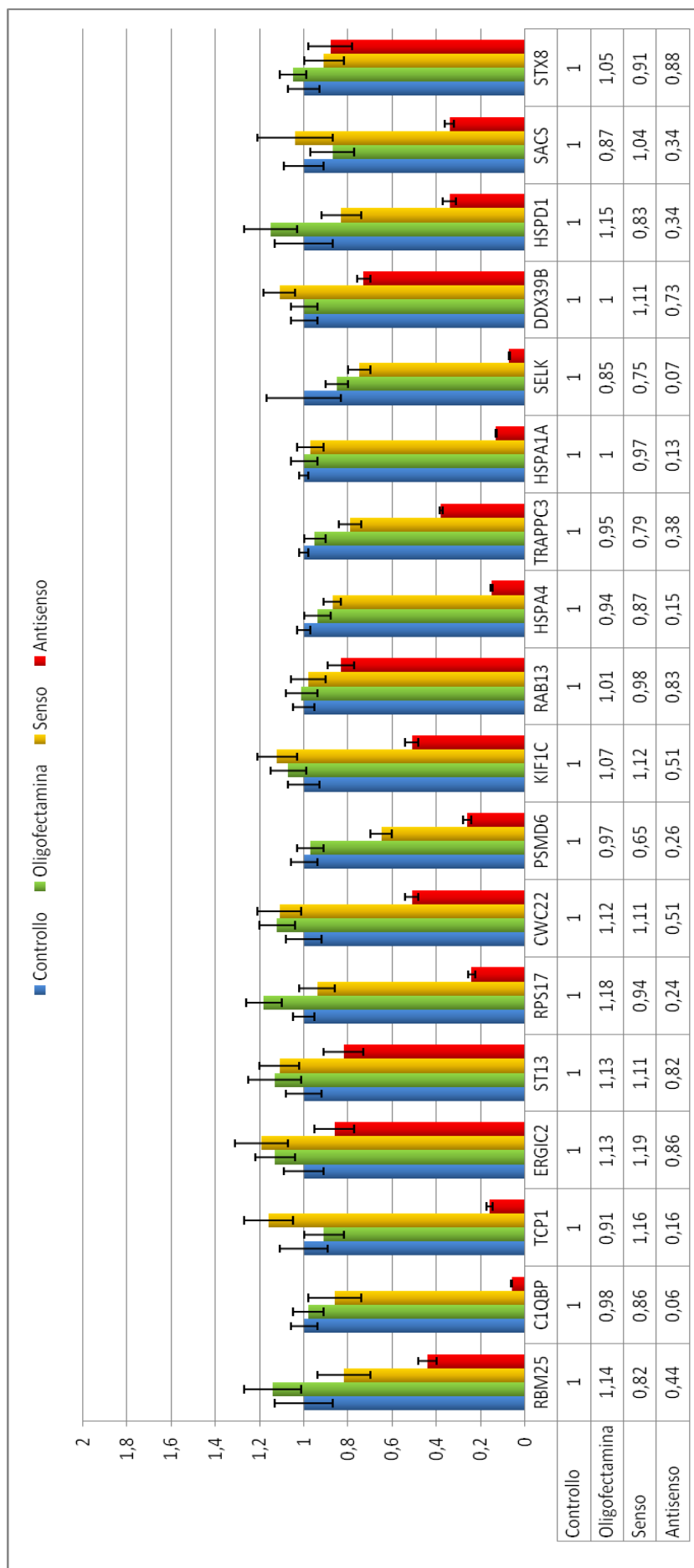


Figura 28 | Risultati di qRT-PCR dei geni down-regolati 6h dopo la trasfezione. Il grafico mostra i livelli di espressione, analizzati tramite qRT-PCR, del mRNA dei geni trovati down-regolati nell'analisi di microarray nelle cellule HeLa trattate con oligofectamina (verde), oligofectamina + oligonucleotide senso (giallo) e oligofectamina + oligonucleotide antisense (rosso) rispetto al controllo (blu). La

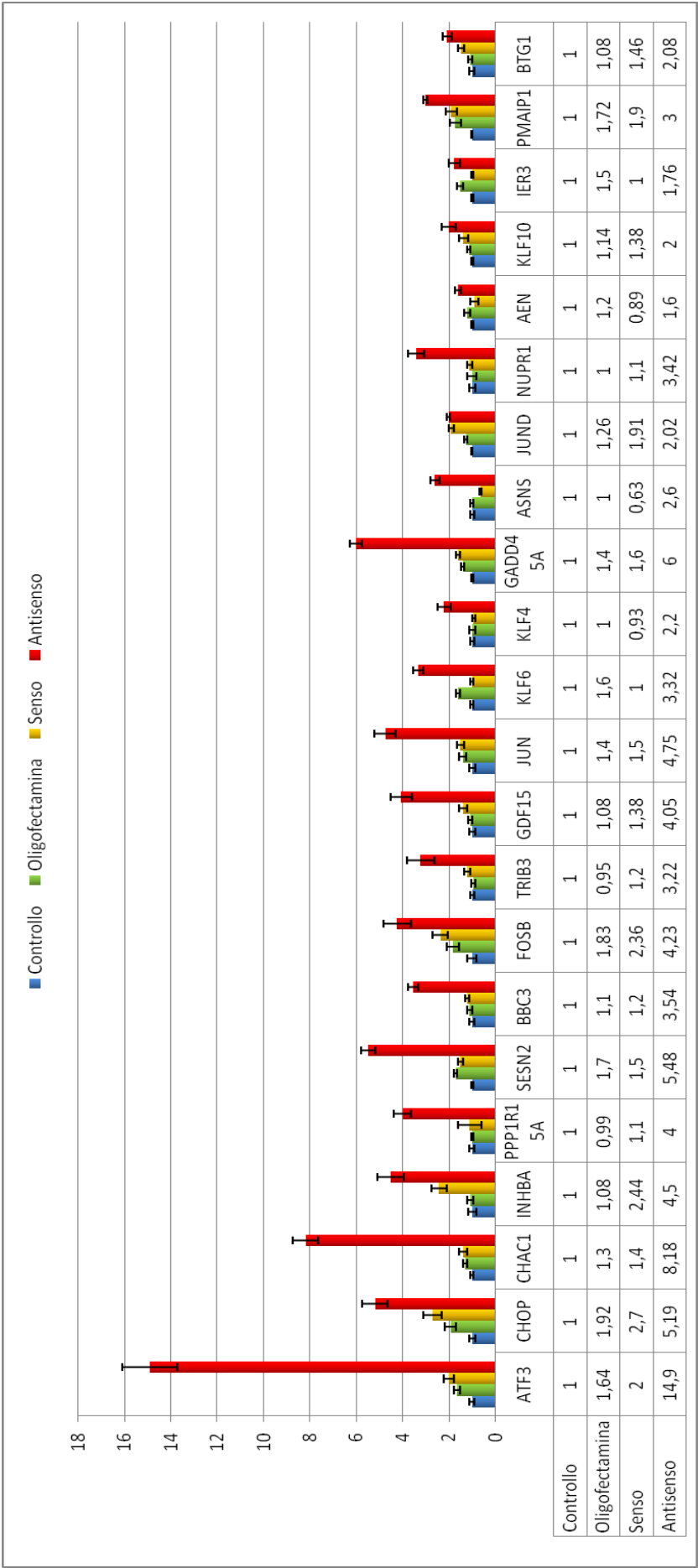


Figura 29 | Risultati di qRT-PCR dei geni up-regolati 6h dopo la trasfezione. Il grafico mostra i livelli di espressione, analizzati tramite qRT-PCR, del mRNA dei geni trovati up-regolati nell'analisi di microarray nelle cellule HeLa trattate con oligofectamina (verde), oligofectamina + oligonucleotide senso (giallo) e oligofectamina + oligonucleotide antisenso (rosso) rispetto al controllo (blu). La normalizzazione è stata effettuata con il gene ACTB.



Figura 30 | Risultati di qRT-PCR dei geni up-regolati 6h dopo la trasfezione. Il grafico mostra i livelli di espressione, analizzati tramite qRT-PCR, del mRNA dei geni trovati up-regolati nell'analisi di microarray nelle cellule HeLa trattate con oligofectamina (verde), oligofectamina + oligonucleotide senso (giallo) e oligofectamina + oligonucleotide antisenso (rosso) rispetto al controllo (blu). La normalizzazione è stata effettuata con il gene ACTB.

Tabella 5 | Confronto dei valori di fold change ottenuti dalle analisi di microarray e qRT-PCR per quanto riguarda i geni up-regolati nelle cellule HeLa silenziate per CSB (campione trattato con oligonucleotidi antisenso) rispetto al controllo.

Geni up-regolati			
Gene	Fold change Antisense VS Controllo Microarray	Fold change	
		Antisense VS Controllo qRT-PCR (normalizzato per ACTB)	Antisense VS Controllo qRT-PCR (normalizzato per HPRT1)
ATF3	15,00	14,90	12,80
CHOP	6,73	5,19	5,56
CHAC1	6,77	8,18	7,30
INHBA	4,20	4,50	4,61
PPP1R15A	4,63	4,00	3,50
SESN2	3,73	5,48	4,65
BBC3	3,78	3,54	3,10
FOSB	4,47	4,23	4,22
TRIB3	3,86	3,22	2,75
JUN	2,73	4,75	4,00
KLF6	2,71	3,32	2,90
KLF4	2,77	2,20	1,90
GADD45A	2,95	6,00	5,10
ASNS	1,56	2,60	2,20
JUND	2,79	2,02	2,09
NUPR1	2,17	3,42	3,00
AEN	2,13	1,60	1,25
KLF10	2,23	2,00	1,63
IER3	2,46	1,76	1,38
PMAIP1	2,22	3,00	2,45
BTG1	2,03	2,08	1,99

Tabella 6 | Confronto dei valori di fold change ottenuti dalle analisi di microarray e qRT-PCR per quanto riguarda i geni down-regolati nelle cellule HeLa silenziate per CSB (campione trattato con oligonucleotidi antisenso) rispetto al controllo.

Geni down-regolati			
Gene	Fold change Antisense VS Controllo Microarray	Fold change	
		Antisense VS Controllo qRT-PCR (normalizzato per ACTB)	Antisense VS Controllo qRT-PCR (normalizzato per HPRT1)
RBM25	0,20	0,43	0,44
C1QBP	0,20	0,05	0,06
TCP1	0,23	0,15	0,16
ERGIC2	0,29	0,81	0,86
ST13	0,34	0,73	0,82
RPS17	0,37	0,23	0,24
CWC22	0,41	0,43	0,51
PSMD6	0,38	0,23	0,26
KIF1C	0,44	0,45	0,51
RAB13	0,38	0,6	0,83
HSPA4	0,50	0,27	0,15
TRAPPC3	0,43	0,6	0,38
HSPA1A	0,47	0,24	0,13
SELK	0,58	0,12	0,07
DDX39B	0,48	0,49	0,73
HSPD1	0,63	0,59	0,34
SACS	0,54	0,6	0,34
STX8	0,45	0,8	0,88

Inoltre, al fine di valutare altri *marker* di espressione dell'ER stress, abbiamo deciso di analizzare, mediante la tecnica di qRT-PCR, i livelli di espressione della forma *spliced*, *unspliced* e *total* (*spliced* + *unspliced*) del mRNA della proteina XBP1 (BOX 1), un fattore di trascrizione indotto in seguito a ER stress e coinvolto nella risposta UPR (Figura 31).

L'analisi ha mostrato un aumento dei livelli del mRNA totale di XBP1 (*fold change* 1,95 – 2,01) e della sua forma *unspliced* (*fold change* 2,16 – 2,13) nelle cellule HeLa silenziate per CSB. Il *fold change* della forma *spliced* (che dovrebbe aumentare in condizioni di ER stress), invece, non mostra variazioni nelle cellule HeLa facendo presupporre la presenza di un *deficit* nel meccanismo di *splicing* di XBP1 quando la proteina CSB è down-regolata.

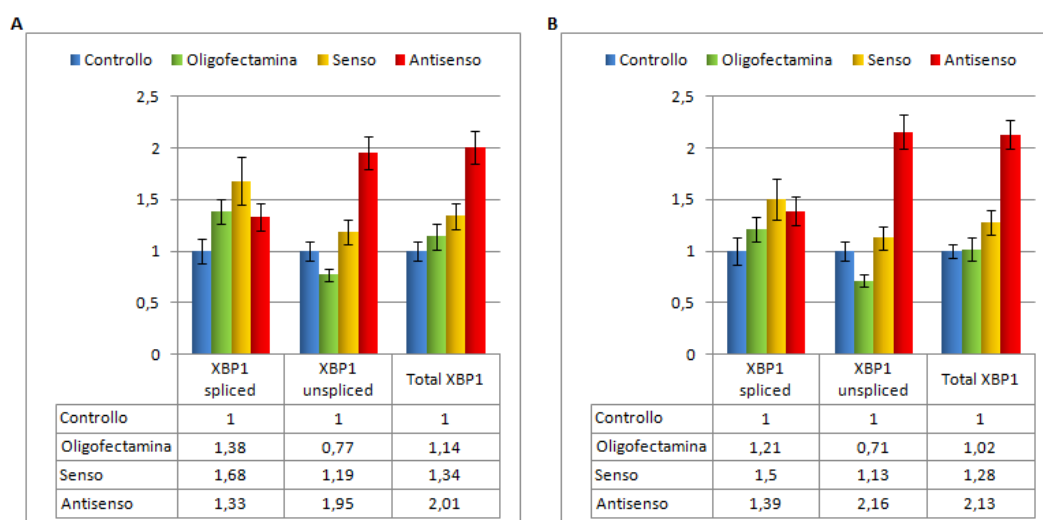


Figura 31 | Analisi di qRT-PCR sulle tre forme del mRNA di XBP1. Il grafico mostra i livelli di mRNA delle tre forme del mRNA di XBP1 (*spliced*, *unspliced* e *total*) nelle cellule HeLa trattate con oligofectamina (verde), oligofectamina + oligonucleotide senso (giallo) e oligofectamina + oligonucleotide antisenso (rosso) rispetto al controllo (blu). La normalizzazione è stata effettuata con i geni *ACTB* (A) e *HPRT1* (B).

4.5 Silenziamento stabile della proteina CSB mediante *Short harpin*

Al fine di creare un modello sperimentale sul quale condurre ulteriori studi che permettano di comprendere il ruolo di CSB all'interno della risposta adattativa che la cellula adotta in seguito a ER stress, abbiamo silenziato stabilmente il gene CSB nelle cellule HeLa.

L'analisi dell'espressione di CSB in seguito al silenziamento tramite trasduzione con lentivirus è stata effettuata tramite Western Blott (Fig. 32-A). La normalizzazione è stata fatta con il gene della RNA-Pol II. L'intensità della banda corrispondente alla proteina CSB è da confrontare con quella corrispondente alla proteina CSB-PGBD3. Questo perché l'mRNA di CSB-PGBD3 non è bersagliato dallo *short harpin* del lentivirus utilizzato per la trasduzione, e quindi i livelli della corrispondente proteina CSB-PGBD3 non variano in risposta al silenziamento. Come è possibile notare, la linea cellulare silenziata, selezionata con una concentrazione di Puromicina corrispondente a 10 µg/ml, presenta il maggior livello di silenziamento. I risultati del Western Blott sono stati confermati mediante analisi dei livelli di espressione del mRNA di CSB nelle cellule HeLa sh-K e sh-CSB tramite qRT-PCR (Figura 32 A e B). La normalizzazione è stata effettuata con i geni ACTB e HPRT1. Anche in questo caso la linea cellulare sh-CSB, selezionata con una concentrazione di antibiotico Puromicina corrispondente a 10 µg/ml, presenta il maggior livello di silenziamento, pari al 65 % (quando il normalizzatore è il gene ACTB) e al 63% (quando il normalizzatore è il gene HPRT1).

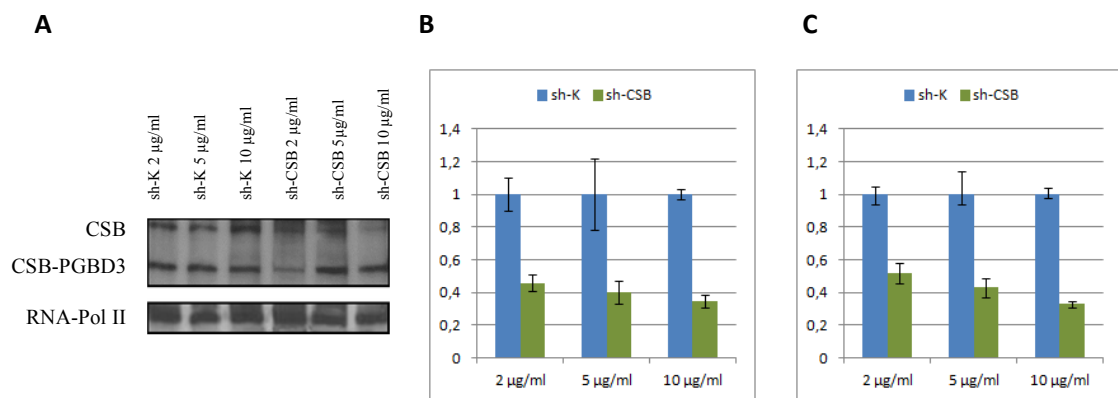


Figura 32 | Silenziamento del gene CSB. Analisi di Western Blott (A) e di qRT-PCR (B e C) che mostrano rispettivamente l'espressione della proteina e del mRNA di CSB in cellule HeLa di controllo (sh-K) e silenziate per CSB (sh-CSB) selezionate con diverse concentrazioni di Puromicina (2, 5 e 10 μg/ml). La normalizzazione è stata effettuata con la proteina RNA-Pol II (A) per il Western Blot e con i geni ACTB (B) e HPRT1 (C) per la qRT-PCR.

4.6 Saggio di proliferazione effettuato con induttori dell'ER stress

Abbiamo successivamente testato l'effetto di sostanze che inducono l'ER stress, quali la *Tunicamicina* e il *DTT*, sulla proliferazione cellulare, sia nelle cellule sh-CSB che nelle cellule sh-K. Questo esperimento è stato condotto al fine di valutare se la ridotta espressione di CSB nelle cellule tumorali possa determinare una minore capacità di risposta a sostanze che inducono ER stress. Come si evince dalla Figura 33, che mostra il numero di cellule relativo in relazione alla dose di sostanza utilizzata, le cellule sh-CSB sono più sensibili al trattamento con gli induttori dell'ER stress, rispetto alle cellule sh-K.

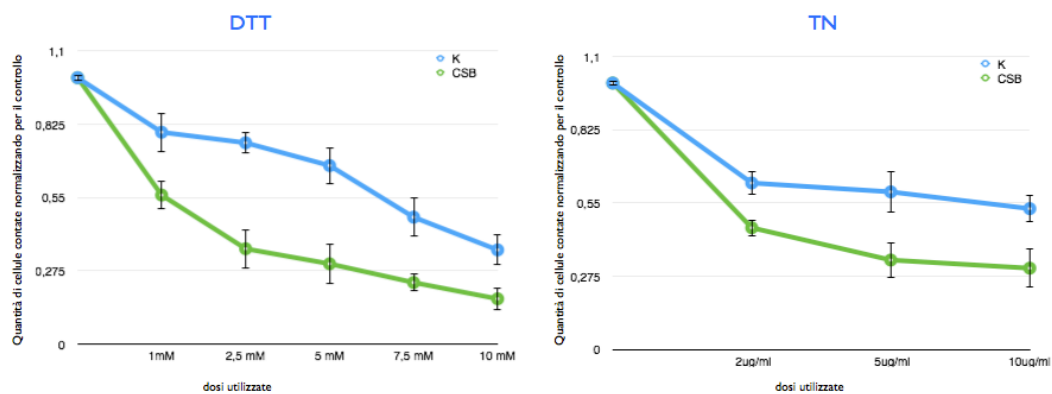


Figura 33 | Saggio di proliferazione cellulare. Grafici relativi all'analisi della proliferazione in cellule HeLa sh-K e sh-CSB, 24 h dal trattamento con dosi crescenti di Tunicamicina (TN) e di DTT. In ordinata è indicata la quantità relativa di cellule e in ascissa la dose di sostanza utilizzata. Ogni valore del numero di cellule relativo ad una specifica dose è stato normalizzato rapportandolo al numero di cellule relativo al controllo corrispondente, nel caso della Tunicamicina e all'unico controllo effettuato, nel caso del DTT. I risultati del grafico sono una media di tre esperimenti indipendenti.

5. Discussione

In questo lavoro di dottorato abbiamo dimostrato che diverse linee e tessuti tumorali sovraesprimono la proteina CSB e che la sua soppressione induce una massiccia morte nelle stesse cellule tumorali. Dagli studi condotti abbiamo scoperto che CSB svolge un importante ruolo nello sviluppo e nella progressione tumorale, funzionando come un oncogene all'interno della cellula neoplastica.

E' ben noto che l'overespressione di oncogeni, quali Ras o Myc, attiva all'interno delle cellule il macchinario di suicidio cellulare, un meccanismo oggi ampiamente accettato come un programma di soppressione tumorale innato¹². Tuttavia, le cellule tumorali evolvono diversi meccanismi per tamponare questa risposta proapoptotica e per portare la cellula al di sopra della soglia di attivazione apoptotica (Figura 2). Riteniamo che CSB possa svolgere un ruolo importante in questo contesto.

In primo luogo, è ragionevole ritenere che la funzione di CSB sia quella di controllare l'attività della proteina p53 prima che le cellule tumorali acquisiscano mutazioni che inattivano, permanentemente, questo soppressore tumorale.

Inoltre, in precedenza è stato dimostrato che CSB svolge anche un ruolo nell'evasione dell'apoptosi p53-indipendente³⁷. Ciò suggerisce che l'overespressione di CSB risulta essere fondamentale per sfuggire all'apoptosi anche più tardivamente quando, cioè, le cellule hanno inattivato il *pathway* di morte cellulare che fa capo alla proteina p53.

Inoltre, l'adattamento alle condizioni d'ipossia è uno *step* fondamentale nella progressione tumorale. Quando la massa tumorale diventa più grande di 2 mm, infatti, non è più supportata dalla preesistente vascolarizzazione e c'è la necessità di generare nuovi vasi sanguigni⁷⁵. E' stato dimostrato che CSB gioca un ruolo fondamentale nei programmi trascrizionali che si trovano sotto il controllo del fattore HIF-1¹⁴. CSB governa l'adattamento alle condizioni d'ipossia che coinvolge anche l'attivazione dell'angiogenesi extravasale, nonché il potenziamento del metabolismo del glucosio, processo noto come *effetto Warburg*^{76, 77}.

Tutti questi processi costituiscono degli *step* fondamentali della progressione tumorale; pertanto riteniamo che rafforzare l'asse CSB/HIF-1 può avere, per le cellule tumorali, l'effetto di ottenere un vantaggio di crescita e sopravvivenza cellulare.

Inoltre, la sovraespressione di CSB conferisce alle cellule tumorali una maggiore capacità di riparazione del DNA, essendo questa proteina coinvolta in ben due meccanismi di riparazione del danno al DNA^{15, 23}.

A conferma dell'importante ruolo che CSB può svolgere quando è up-regolata nelle cellule tumorali, abbiamo dimostrato che l'inibizione di questa proteina induce una riduzione della vitalità e della proliferazione cellulare, e conduce le cellule tumorali alla morte (Figure 20-B, 21 e 23 A-B). Nello specifico, abbiamo visto che l'inibizione dell'espressione della proteina CSB nelle cellule tumorali HeLa, MGH e USB ha degli effetti drammatici sulla loro vitalità cellulare (Figure 20-A e 20-F).

Le cellule HeLa, 48h dopo la trasfezione, quando trattate con le combinazioni oligonucleotidiche 9+11 e 7+9+11 mostrano una riduzione della vitalità del 91,5% e 90% rispettivamente (Figura 20-A). Nella linea tumorale MGH, il trattamento con la combinazione oligonucleotidica antisenso 7+9+11 ha determinato una riduzione della vitalità del 72%; lo stesso risultato è stato confermato nella linea tumorale USB in cui si è ottenuta una riduzione del 69% (Figura 20-F).

Questi risultati confermano il ruolo chiave svolto dalla proteina CSB nel mantenimento della sopravvivenza e della vitalità cellulare e nel proseguimento dello sviluppo tumorale. Gli effetti dovuti all'inibizione di questa proteina si ripercuotono anche sulla proliferazione, sul ciclo cellulare e sull'apoptosi delle cellule HeLa. Abbiamo visto che nelle cellule HeLa silenziate per CSB si ha una drastica riduzione della proliferazione cellulare che è ben evidente a 72h dalla trasfezione (Figura 21). In particolare sembra ci sia un vero e proprio arresto della proliferazione cellulare nell'arco di tempo che va dalle 48 alle 72 ore dopo il trattamento (Figura 21).

L'analisi del ciclo cellulare effettuata tramite Citofluorimetria bivariata, condotta su cellule HeLa, ha confermato una sostanziale alterazione del ciclo cellulare in seguito all'inibizione della proteina CSB (Figura 22). Infatti, risulta evidente che nei campioni trattati con gli oligo antisenso è presente una popolazione sub-G1 apoptotica non presente nei campioni trattati con i rispettivi oligo senso; vi è, inoltre, una sostanziale scomparsa della popolazione G2 e un rallentamento o blocco della fase S. Entrambi i risultati, ottenuti dall'analisi della proliferazione e del ciclo cellulare, confermano il fatto che la perdita della proteina CSB determina una sostanziale riduzione della proliferazione cellulare, e questo è avvalorato anche dal

fatto che osserviamo un blocco durante la fase S del ciclo cellulare (Figura 22).

Questi risultati sono stati confermati mediante una valutazione dei livelli apoptotici, nelle cellule HeLa silenziate per CSB, tramite un saggio specifico per la rilevazione della morfologia apoptotica (Figura 23 A-C). Le cellule tumorali HeLa mostrano elevati tassi di morte cellulare in seguito al silenziamento di CSB, in particolare, la combinazione oligonucleotidica 7+9+11 induce un aumento dei livelli apoptotici pari al 59% rispetto al campione trattato con la combinazione oligonucleotidica senso 7+9+11 (Figura 23 A e B). La soppressione della proteina CSB come abbiamo detto in precedenza, potrebbe ripristinare l'attività proapoptotica della proteina p53; inoltre, l'arresto dei meccanismi di trascrizione e replicazione del DNA dovuti alla mancanza di CSB potrebbero essere fatali per la cellula.

Come atteso, non abbiamo osservato simili livelli apoptotici nelle linee non tumorali di controllo (C3PV) (Figura 23-C). Le cellule normali, infatti, non sono dipendenti dalla continua attività di un oncogene sovraespresso e normalmente si trovano ben lontane dalla soglia apoptotica, per questo il solo silenziamento della proteina CSB non ne induce la morte.

Questo risultato è di notevole importanza se si pensa a un suo possibile utilizzo a livello traslazionale come strategia antitumorale, dal momento che tale trattamento risulterebbe poco tossico per le cellule sane.

Infine, abbiamo voluto valutare l'efficacia dell'inibizione dell'attività della proteina CSB, nel potenziare l'azione di alcuni farmaci chemioterapici. Come si evince dai grafici (Figura 23-D), alla dose di 100 nM della combinazione oligonucleotidica utilizzata si ha una riduzione di circa il 60% dei livelli di vitalità cellulare per tutti e tre i chemioterapici (Oxaliplatino, Mitomicina C e 5-Fluorouracile), rispetto ai campioni non silenziati per CSB e trattati con le stesse dosi di chemioterapico. Inoltre, le cellule normali C3PV non risultano sensibili né al singolo trattamento (ASO o Oxaliplatino) né a quello combinato, almeno alle dosi utilizzate nelle cellule HeLa (Figura 23-E).

Questo risultato suggerisce che il trattamento combinato (oligonucleotide antisense per silenziare CSB e farmaci antitumorali) ha l'effetto di aumentare la sensibilità delle cellule tumorali alla terapia.

In questo modo, il silenziamento della proteina CSB avrebbe duplici vantaggi:

riducendo la dose di chemioterapico verrebbe ridotta di molto la tossicità dovuta all'uso di questi farmaci classici, che danneggiano il DNA, e che molto spesso sono causa di gravi danni agli organi e ai tessuti sani; inoltre, potrebbero essere evitati i fenomeni di farmaco resistenza, causa della mancanza di efficacia di alcune terapie, in quanto CSB è coinvolta nella riparazione dei danni al DNA e la sua inibizione determinerebbe una minore riparazione del danno al DNA ed un maggiore effetto della terapia⁷⁸. Studi recenti hanno dimostrato, ad esempio, che l'ablazione di alcune proteine coinvolte nel meccanismo di riparazione associato alla trascrizione (TCR), aumenta la sensibilità al cisplatino (agente che crea *crosslink* inter- e intra-filamento) di diverse linee cellulari di carcinoma della prostata e del colon-retto con specifici difetti in p53 e/o in proteine coinvolte nel meccanismo di riparazione del danno al DNA noto come *mismatch repair*⁷⁹.

Nella seconda parte di questo lavoro di dottorato ci siamo interessati di comprendere il ruolo che CSB svolge nel promuovere il fenotipo tumorale e il meccanismo che sottostà all'induzione del processo apoptotico in seguito al suo silenziamento. In particolare, abbiamo cercato di comprendere in quali *pathway* CSB esplica la sua funzione oncogenica e quali meccanismi molecolari sono attivati o repressi in seguito al suo silenziamento.

Dall'analisi dei geni differenzialmente espressi, tra i campioni HeLa silenziati ed i campioni di controllo, è emerso che diversi geni sono up- e down-regolati già 6h dopo il silenziamento (Tabelle 1 e 2). Inoltre, la caratterizzazione funzionale dei geni differenzialmente espressi ha permesso di evidenziare che molti di essi svolgono un importante ruolo nel *pathway* definito *Unfolded Protein Response* (UPR). Come ci aspettavamo, molti dei geni up-regolati sono pro-apoptotici e la maggior parte di essi sono regolati trascrizionalmente dalla proteina ATF4. Tra questi, i primi ad essere attivati trascrizionalmente da ATF4, in seguito a ER, sono PPP1R15A (o GADD34) e XBP1, che i nostri dati mostrano essere up-regolati (*fold change* rispettivamente di 4,63 e 2,01) (Tabella 5). La funzione delle proteine trascritte a partire da questi due geni è quella di tentare di risolvere la condizione di *stress* all'interno della cellula, cercando di ripristinare l'omeostasi cellulare (BOX 1). Nel caso in cui ciò non avvenga, la risposta UPR prevede l'attivazione del processo apoptotico. Anche in questo caso la proteina ATF4 riveste un importante ruolo promuovendo l'espressione

di ATF3 (*fold change* 15,00) e altri geni proapoptotici come CHAC1 (*fold change* 6,77), GADD45A (*fold change* 2,95), ASNS (*fold change* 1,56) e NOXA (*fold change* 2,22) (Tabella 5). Un altro fondamentale mediatore del processo apoptotico indotto in seguito ad ER *stress* è il fattore di trascrizione CHOP61 (o GADD153), il cui gene mostra una significativa up-regolazione nelle cellule silenziate rispetto ai controlli (*fold change* 6,73). CHOP attiva la trascrizione di diversi geni che potenziano il processo apoptotico come GADD34, PUMA (o BBC3) e TRIB3, geni che noi abbiamo trovato up-regolati nei nostri dati di microarray (*fold change* 4,63, 3,86 e 3,78 rispettivamente) (Tabella 5).

Questi dati di microarray (peraltro confermati dalla successiva analisi di qRT-PCR) hanno mostrato, quindi, una over-espressione di differenti geni apoptotici, e non solo, coinvolti nella risposta UPR. Questo scenario suggerisce che nelle cellule silenziate per CSB, un ER *stress* persistente induce il processo apoptotico e non una risposta adattativa.

Le cellule tumorali, come le HeLa, presentano una condizione di ER *stress* fisiologica⁴⁶. La grande richiesta proteica, necessaria al mantenimento e alla progressione tumorale fa sì che il macchinario traduzionale sia iperattivo; questo porta alla sintesi di un elevato numero di proteine con un possibile aumento della presenza di proteine *unfolded* e/o *misfolded*. Le cellule silenziate per CSB non sembrano essere in grado di rispondere in maniera adeguata all'ER *stress*, se non indirizzando l'espressione genica alla trascrizione di geni pro-apoptotici andando, pertanto, incontro a morte. Questa analisi ci ha permesso, quindi, di ipotizzare un possibile meccanismo responsabile dell'induzione dell'apoptosi osservata in seguito al silenziamento di CSB. Studi che si stanno effettuando contemporaneamente, nel nostro laboratorio, hanno messo in evidenza una possibile interazione di CSB con diverse proteine coinvolte nel processo dello splicing (quali, ad esempio PRPF8, PRPF4, PRPF3, HNRNPU, CSTF1)⁸⁰. Il *deficit* di CSB potrebbe alterare l'assemblaggio del macchinario di *splicing*. Dal momento che un efficiente processo di *splicing* è necessario per avere un mRNA correttamente processato che possa funzionare da stampo per la sintesi proteica, un'alterazione di questo processo, dovuto ad un errato assemblaggio del macchinario, potrebbe risultare nell'accumulo di proteine non correttamente foldate, innescando la risposta UPR. Questo *deficit* nel

processo di *splicing*, spiegherebbe anche il risultato di qRT-PCR per quanto riguarda le forme *spliced*, *unspliced* e *total* (*spliced* + *unspliced*) di XBP1 (Figura 31). Utilizzando come primer reverse una sequenza che riconosce tutte e tre le forme del mRNA di XBP1, e come primer forward, un primer specifico per ogni forma, siamo andati a valutare il rapporto tra la forma *spliced* e quella *unspliced* rispetto all'mRNA totale di XBP1. In accordo con quanto discusso finora, ci aspettavamo di ottenere un incremento sia della forma *unspliced*, come segnale dell'aumento dell'espressione del gene XBP1, sia della forma *spliced*, indice dell'azione dell'endonucleasi IRE1 α . Al contrario, i dati di qRT-PCR hanno mostrato che l'aumento della mRNA *total* di XBP1 è dovuto esclusivamente all'incremento della forma *unspliced*. Questa anomalia potrebbe essere dovuta ad un *deficit* nel macchinario di *splicing*. Inoltre, visto che il *pathway* IRE1 α rappresenta principalmente un'importante via di sopravvivenza per la cellula in seguito a ER *stress* (BOX 1), l'impossibilità di portare a termine questa segnalazione intracellulare *pro-survival* è in accordo con l'elevato tasso di apoptosi a cui vanno incontro le cellule in seguito al silenziamento di CSB.

Quale sia il vero collegamento tra CSB e il *pathway* UPR rimane comunque ancora da capire. C'è da chiedersi anche se il ruolo della proteina CSB è limitato alla regolazione della risposta UPR o se sia coinvolto anche in altri meccanismi, la cui alterazione comprometterebbe la vitalità della cellula. Verosimilmente la funzione biologica di CSB abbraccia più *pathway* all'interno della cellula. In tal senso, c'è la necessità di collocare all'interno di un contesto cellulare anche gli altri geni che i dati di microarray ci hanno mostrato differenzialmente espressi in seguito al silenziamento di CSB.

Tra i geni down-regolati troviamo, ad esempio, diverse *heat-shock protein*. Il ruolo fisiologico delle *heat shock protein* è quello di coadiuvare le proteine nel loro processo di folding. La down-regolazione di questi geni collide con l'attivazione del *pathway* UPR, in quanto uno dei meccanismi con i quali la cellula cerca di ripristinare l'omeostasi in seguito a ER *stress*, è proprio quello di promuovere l'espressione di proteine coinvolte nel folding proteico, come appunto le *heat shock protein*⁵¹. Questo *deficit* di *heat shock protein* potrebbe concorrere all'incapacità della cellula di risolvere l'ER *stress*, se non andando incontro a morte. Nascono spontanee due domande. Può CSB svolgere un ruolo nell'attivazione di alcuni

chaperoni? Può, all'interno della cellula, essere in qualche modo coinvolta nel meccanismo che porta al giusto folding proteico?

Sappiamo oggi che la regolazione dell'espressione dei geni *heat shock protein* avviene ad opera del fattore di trascrizione HSF-1, il quale si lega ai loro promotori e ne induce la trascrizione⁸¹. Nella sua azione di attivare la trascrizione di questi geni, HSF-1 necessita, a livello dei promotori, anche della presenza del coattivatore trascrizionale p300⁸¹. Evidenze recenti hanno mostrato un ruolo nella regolazione trascrizionale della proteina CSB. Questa funzione si esplica con la capacità di CSB di riequilibrare all'interno della cellula la disponibilità di importanti coattivatori trascrizionali, come, ad esempio, proprio p300. Un'ipotesi interessante, quindi, è quella secondo la quale l'assenza di CSB potrebbe far diminuire la disponibilità del fattore p300¹⁴. Di conseguenza, la mancanza di p300 disponibile non permetterebbe a HSF-1 di esplicare la propria funzione. Questo potrebbe portare ad una down-regolazione dei geni *heat shock protein* nelle cellule HeLa in cui è stato silenziato CSB, ed ad una incapacità di rispondere all'ER *stress*. Tutto ciò ovviamente rapportato ai controlli che, ricordiamo, presentano un'attivazione "fisiologica" dell'UPR e dei geni *heat shock protein* in quanto cellule tumorali.

Rimanendo nell'ambito della regolazione trascrizionale, un altro filone di ricerca riguarderebbe i risultati del software *Genomatix* (Tabelle 3 e 4). Verificare l'interazione fisica e/o funzionale di CSB con uno o più dei fattori di trascrizione predetti dal software potrebbe spiegare l'up- e la down-regolazione di molti geni.

Il nostro passo successivo è stato quello di creare un modello sperimentale sul quale effettuare ulteriori studi. A tal proposito abbiamo silenziato stabilmente (con un efficienza di silenziamento di circa il 64%) il gene CSB all'interno delle cellule HeLa (Figura 32-C); questo al fine di poter compiere studi a lungo termine rispetto a delle cellule silenziate in maniera transiente su cui è possibile effettuare esperimenti per un massimo di 72h dopo la trasfezione.

Su queste cellule abbiamo poi effettuato un saggio di proliferazione valutando l'effetto di induttori chimici dell'ER *stress*, quali *Tunicamicina* e *DTT*, sulla crescita tumorale in cellule sh-CSB e sh-K. I risultati hanno evidenziato una maggiore suscettibilità delle cellule silenziate per CSB a queste sostanze, a conferma del

possibile ruolo che la proteina CSB ha nel proteggere le cellule tumorali dall'ER *stress* (Figura 33). Questo rappresenta comunque un esperimento preliminare che necessita di essere confermato. Inoltre, su queste stesse cellule è possibile, e nostra intenzione, effettuare ulteriori saggi che permettano di valutare altri parametri, come, ad esempio, la vitalità e il tasso apoptotico, evidenziando il differente comportamento che hanno le cellule sh-CSB e le cellule sh-K in risposta al trattamento con queste e altre sostanze.

Le cellule sh-CSB, quindi, si offrono come utile strumento per andare a capire a che livello l'assenza di CSB rende divergenti le risposte UPR all'interno delle cellule silenziate e non, in modo da comprendere il ruolo che la proteina CSB occupa all'interno di questo *pathway*.

Rimane quindi molto da fare ancora per comprendere sia qual è il ruolo che la proteina CSB svolge nelle cellule tumorali che la sovraesprimono, sia qual è il meccanismo che porta queste cellule a morire per apoptosi in seguito al suo silenziamento. Un'ulteriore comprensione del ruolo di CSB all'interno delle cellule tumorali potrebbe fare di CSB un nuovo target terapeutico per la cura del cancro.

6. Conclusioni

Nel loro insieme questi risultati mettono in luce il ruolo oncogenico della proteina CSB. Nuove analisi devono essere effettuate per comprendere se la sovraespressione di CSB è limitata ad alcuni *subset* di tumori e/o a specifiche combinazioni di mutazioni genetiche. Inoltre, sarebbe interessante comprendere il meccanismo che porta alla up-regolazione della proteina CSB nelle cellule tumorali. Riarrangiamenti genomici, incluse l'aneuploidia e la poliploidia, potrebbero spiegare l'aumento dei livelli di CSB.

È importante sottolineare che l'inibizione di CSB può rappresentare un valido *target* chemioterapico; infatti, a differenza delle classiche terapie antitumorali che bersagliano il DNA e possono determinare la formazione di tumori secondari danneggiando le cellule sane, la soppressione di CSB evita questa complicità. In alternativa, si può ipotizzare che la soppressione transiente di CSB durante un ciclo di chemioterapia potrebbe consentire l'utilizzo di una dose ridotta di agente chemioterapico che in questo modo risulterebbe meno dannoso per le cellule sane.

Infine, questo lavoro ci ha permesso di arrivare alla conclusione che l'overespressione di CSB protegge le cellule tumorali dall'ER *stress*. I dati provenienti dalle analisi di *microarray* e di qRT-PCR evidenziano in maniera inesorabile un coinvolgimento della proteina CSB nella risposta che la cellula attua in seguito all'ER *stress*. Ulteriori studi sono necessari per capire a che livello del *pathway* questo coinvolgimento effettivamente si verifica. Per questo si rendono necessari ulteriori studi che ci permettano di capire dove CSB agisca precisamente. Non è da escludere un suo coinvolgimento nella regolazione trascrizionale di alcuni geni, quali ad esempio cheperoni molecolari, che abbiamo trovato differenzialmente espressi nelle cellule silenziate per CSB rispetto al controllo. Questa ipotesi si basa sull'evidenza che la proteina CSB è in grado di ridistribuire all'interno della cellula importanti coattivatori trascrizionali come p300, regolandone la disponibilità ad altri fattori di trascrizione¹⁴. Dall'altra parte, ci potrebbe essere un suo coinvolgimento diretto in uno o più dei *pathway* che costituiscono la risposta UPR. Questo spiegherebbe il mancato tentativo da parte della cellula silenziata di contrastare l'ER *stress*.

Quello che è sicuro è l'azione protettiva che la proteina CSB svolge nei confronti della proliferazione delle cellule HeLa, e il saggio di proliferazione che abbiamo condotto ne è un'ulteriore prova.

Il nostro obiettivo futuro sarà capire a livello di quale *step* l'assenza di CSB rende divergenti le risposte UPR all'interno delle cellule silenziate e non, in modo da comprendere la funzione della proteina CSB all'interno di questo *pathway*.

La caratterizzazione il più possibile dettagliata del ruolo che CSB occupa all'interno delle cellule HeLa, e in generale anche in altre linee cellulari tumorali, getterebbe le basi per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali che abbiano CSB come *target*.

7. Materiali e metodi

- Linee cellulari

Le linee cellulari HeLa, MGH e USB sono state cresciute in terreno D-MEM (Invitrogen by Life Technologies), siero FBS al 10% (FBS South America, Invitrogen by Life Technologies) e antibiotici. Le cellule tumorali della prostata (PC3) sono state coltivate in RPMI contenente 10% di siero FBS (FBS South America, Invitrogen by Life Technologies) e antibiotici. Le cellule normali della prostata (RWPE1) sono state cresciute in Keratinocyte medium (Invitrogen by Life Technologies) con EGF (5 ng/ml) e BPE (0.05 mg/ml). La linea cellulare di fibroblasti normali umani (C3PV) è stata cresciuta in terreno MEM (Invitrogen, Invitrogen by Life Technologies) contenente il 15% di siero fetale bovino (FBS United States, Invitrogen by Life Technologies), amminoacidi essenziali e non essenziali, vitamin e antibiotic. Le cellule tumorali della ghiandola mammaria sono state cresciute in MEM (Invitrogen by Life Technologies) contenente 0.6 ug/ml di insulina e 10% di siero (FBS South America, Invitrogen by Life Technologies). La linea cellulare epiteliale non tumorigenica della ghiandola mammaria (MCF10A) e' stata coltivata in DMEM contenente EGF (20 ng/ml), Tossina Colerica (100 ng/ml), idrocortisone (500 ug/ml), insulina (0.01 mg/ml) e 5% di siero equino (Invitrogen, by Life Technologies).

- Western Blotting

Questa tecnica è stata utilizzata sia per verificare la sovraespressione di CSB nelle varie linee tumorali in confronto alle linee normali che il silenziamento stabile di CSB nelle cellule HeLa.

Le cellule in coltura sono state recuperate e centrifugate a 1500 rpm per 5 min. Le cellule sono state lisate incubando il pellet cellulare per 20 minuti in ghiaccio con il buffer TPA. Il volume di *buffer* TPA aggiunto corrisponde a circa 5 volte il volume del pellet cellulare.

Il *buffer* TPA è costituito da:

- Hepes 1M
- Glicerolo 100%
- NaCl 5M
- MgCl₂ 1M
- EDTA 0,25M
- DTT 100mM
- NP40 10%
- Inibitore delle Proteasi 25X
- H₂O

L'estratto cellulare è stato centrifugato a 11000 rpm per 15 minuti a 4 °C ed è stato recuperato il sovranatante. A questo punto è stata determinata la concentrazione proteica utilizzando il fluorimetro Qubit[®] (Invitrogen by Life Technologies). Le proteine sono state separate con la tecnica dell'SDS-PAGE.

La membrana di nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo primario H-300 (sc-25370, Santa Cruz Biotechnology), IgG policlonale *rabbit* che riconosce l'epitopo corrispondente agli amminoacidi 1-300 dell'N-terminale della proteina CSB. L'anticorpo H-300 è sciolto in *buffer* PBST con una diluizione di 1:10000. L'incubazione è avvenuta o.n. a +4 °C in lenta agitazione. Il giorno successivo la membrana viene sottoposta a tre lavaggi con PBST, di 5 min l'uno, per eliminare l'anticorpo in eccesso. La membrana, a questo punto, è stata incubata con un anticorpo secondario per rilevare l'interazione proteina-Ab. L'anticorpo secondario usato è una IgG (H+L) *goat anti-rabbit* coniugato con l'enzima perossidasi (111-036-003, Jackson ImmunoResearch). L'anticorpo secondario è sciolto in *buffer* PBST con una diluizione di 1:10000. L'incubazione è avvenuta per 45 min, a temperatura ambiente, in agitazione. Dopo ulteriori tre lavaggi con PBST di 5 min l'uno, la membrana è stata incubata con una soluzione (ECL) contenente il substrato dell'enzima coniugato all'Ab secondario, che, per via enzimatica, viene convertito in un prodotto chemiluminescente rilevabile mediante lastra autoradiografica. Per la normalizzazione sono stati utilizzati i geni *housekeeping* actina (sc-47778, Santa

Cruz Biotechnology) o RNA polimerasi II (C-18, sc-5943, Santa Cruz Biotechnology).

- Estrazione del RNA da tessuti FFPE e qRT-PCR

I tessuti FFPE di pazienti affetti da cancro colon-rettale sono stati forniti dall'azienda ospedaliera di Belcolle di Viterbo grazie alla collaborazione nata con il primario del reparto di Anatomia Patologica, Dott. Vito Gomes. L'estrazione del RNA dai tessuti FFPE è stata effettuata utilizzando il kit Qiagen (RNeasy FFPE kit). Abbiamo valutato l'integrità del RNA mediante corsa denaturante in un gel di agarosio e sintetizzato il cDNA a partire da 1 µg di RNA totale utilizzando il kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Abbiamo ingegnerizzato dei primer per l'amplificazione di CSB e dei due normalizzatori a partire dal 3' del mRNA che producessero un amplificato di massimo 100-130 basi questo al fine di poter migliorare l'amplificazione anche del mRNA degradato.

Il volume finale di ciascuna reazione di amplificazione è di 25 µl. La mix di reazione di amplificazione è costituita da:

- 12,5 µl Master mix 2X (Promega)
- 1 µl Primer forward (stock 100 pM)
- 1 µl Primer reverse (stock 100 pM)
- 5,5 µl H₂O RNase & Dnase free
- 5 µl cDNA

Il programma di temperature utilizzato per l'amplificazione è stato il seguente:

- 10 minuti a 95°C per l'attivazione della Taq Polimerasi
 - 30 secondi a 95°C per la denaturazione del DNA
 - 1 minuto a 58°C per l'appaiamento dei primer
 - 30 secondi a 72°C per la fase di estension
- } 40 cicli

- Progettazione degli Oligonucleotidi

Per i nostri studi sono state disegnate 9 diverse sequenze oligonucleotidiche antisense, in grado di ibridare con differenti regioni del mRNA codificante per CSB, tramite l'utilizzo del *software* IDT (Integrated DNA Technologies); gli oligonucleotidi sono stati scelti basandosi su criteri generali termodinamici di stabilità. Infatti, la capacità dell'oligonucleotide antisense di legare il suo *target* può essere influenzata sia dalle strutture secondarie del mRNA bersaglio, sia dal *folding* dello stesso oligonucleotide, che dalla stabilità del duplex oligo-mRNA bersaglio^{45,46}. Al fine di evitare la formazione di strutture secondarie, si sono evitate le ripetizioni nucleotidiche e le sequenze palindrome di 6 o più basi. Si è cercato, inoltre, di rappresentare nella sequenza tutte e 4 le basi del DNA (guanina, citosina, adenina e timina) per evitare sequenze ripetute che avrebbero potuto ibridare con zone aspecifiche.

- Analisi di immunofluorescenza

Le cellule HeLa e C3PV sono state cresciute per due giorni con delle biglie fluorescenti di diverse dimensioni (Fluoresbrite Carboxylate Microspheres, Polysciences): HeLa (biglie autofluorescenti verdi, 0.75 μm), C3PV (biglie autofluorescenti verdi, 2 μm), e seminate (in un rapporto 1:1) su dei vetrini di microscopia e mantenute in coltura per due giorni. Le cellule sono state, poi, fissate con 3% paraformaldeide e permeabilizzate usando PBS/0.5% Triton. La proteina CSB è stata marcata con l'anticorpo primario H300 (Santa Cruz Biotechnology) riconosciuto dall'anticorpo secondario, anti-rabbit made in goat, Alexa Fluor 633 (Invitrogen by Life Technologies). L'immunolocalizzazione e l'analisi confocale è stata effettuata come precedentemente descritto nel lavoro Dubaele et al, 2003.

- Trasfezione

Le cellule sono state seminate un giorno prima della trasfezione (utilizzando piastre six well o 24 well), con terreno completo senza antibiotici. Al momento della trasfezione le cellule si trovano ad un 30-50% di confluenza. La trasfezione, effettuata il giorno dopo la semina, è stata eseguita utilizzando il terreno Opti-MEM® (Invitrogen by Life Technologies) in assenza di siero e di antibiotici. Per ogni campione sono state seminate 1×10^5 cellule nelle piastre 6 well, ed il giorno dopo è stata preparata una eppendorf contenente 10 μ l di oligonucleotide (stock 20 μ M), senso o antisenso, in 175 μ l di Opti-MEM, ed un'altra contenente 4 μ l di oligofectamina (Invitrogen by Life Technologies), diluita in 11 μ l di Opti-MEM. Dopo cinque minuti d'incubazione a temperatura ambiente, 15 μ l della soluzione contenente l'oligofectamina è stata trasferita nell'eppendorf contenente l'oligonucleotide diluito. Dopo venti minuti d'incubazione a temperatura ambiente 200 μ l della soluzione finale sono stati aggiunti goccia a goccia alle cellule a cui, nel frattempo, è stato tolto il terreno della semina, sono stati effettuati due lavaggi con PBS (Invotrogen by Life Technologies), ed aggiunti 800 μ l di Opti-MEM senza siero ed antibiotici. Il volume finale di trasfezione di ciascun pozzetto è di 1 ml. La concentrazione finale di oligonucleotide nel terreno di trasfezione (1 ml) è pari a 200 nM. Per le combinazioni oligonucleotidiche, la quantità di oligonucleotide aggiunto è stata dimezzata (combinazioni oligonucleotidiche 7+9, 7+11 e 9+11 e controlli 7+9, 7+11 e 9+11) o suddivisa in tre parti (combinazione oligonucleotidica 7+9+11) in maniera tale da avere una concentrazione finale sempre di 200nM. Dopo 4 h di incubazione a 37 °C, per arrestare la trasfezione, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto della well 500 μ l di terreno opti-MEM contenente una concentrazione 3 volte superiore di siero (30% per le cellule tumorali, 45% per le cellule normali). I saggi per valutare gli effetti del silenziamento sono stati eseguiti entro le 72h dal momento della trasfezione.

- Saggio MTT

Questo saggio si basa sull'utilizzo della sostanza Metil Triazol Tetrazolio (MTT, Sigma). Questa molecola, di color giallo, viene ridotta in una sostanza chiamata formazano, di colore viola, nei mitocondri delle cellule vive mostrando così un colore intenso viola nelle cellule vitali quando viene aggiunta una soluzione di lisi.

La conversione della sostanza MTT in formazano è direttamente proporzionale alla vitalità ed al numero di cellule presenti nel campione analizzato.

L'assorbanza di questa soluzione colorata può essere quantificata tramite la misurazione ad una precisa lunghezza d'onda (solitamente 570 nm) allo spettrofotometro.

Per effettuare questo saggio sono state seminate, nelle piastre 24 well, 2×10^4 cellule per punto sperimentale. La trasfezione, con oligonucleotidi senso o antisense, è stata effettuata il giorno dopo la semina ed il saggio MTT è stato condotto 48 h dopo la trasfezione. Tre ore prima dello scadere di questo tempo, in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 37.5 μ l della soluzione stock di MTT (5 mg/ml sciolti in PBS) in 375 μ l totali di terreno (Opti- MEM). La piastra è stata incubata a 37 °C per tre ore. Allo scadere del tempo è stato rimosso il terreno contenente l'MTT, e senza effettuare alcun lavaggio, sono stati aggiunti 375 μ l (pari al volume di terreno prima presente nel pozzetto) di una soluzione di lisi (10% SDS, 0.6% acido acetico sciolti in DMSO) per disciogliere i cristalli di formazano che si sono prodotti. La piastra è stata mantenuta in agitazione per qualche minuto e letta tramite l'utilizzo dello spettrofotometro DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter) alla lunghezza d'onda sia di 630 nm (*background*) che di 570 nm. I valori delle assorbanze corrispondenti a ciascun campione, sono stati ottenuti sottraendo il valore ottenuto alla lunghezza d'onda di 630 nm a quello acquisito a 570 nm. Le analisi sono state condotte in quadruplicato.

- Saggio MTT effettuato con antitumorali

Il saggio MTT condotto per calcolare le dosi di vari chemioterapici necessarie per ridurre la vitalità cellulare del 50% (IC_{50}) è stato effettuato 48h dopo il trattamento con gli agenti antitumorali. Sono state seminate 2×10^4 cellule nelle piastre 24 well, ed il giorno dopo sono state trattate con l'oligofectamina (Invitrogen by Life Technologies) aggiungendo un volume di acqua sterile pari a quello che si sarebbe dovuto aggiungere in termini di oligonucleotide. 24h dopo le cellule sono state trattate con dosi crescenti di chemioterapici (le dosi sono state scelte basandosi sulle conoscenze presenti in letteratura) e dopo ulteriori 48h è stata condotta l'analisi della vitalità cellulare. Una volta determinate le dosi di chemioterapici alle quali si aveva una riduzione della vitalità del 50% (0,55 μ M Oxaliplino, 0,50 μ g/ μ l Mitomicina C e 3 μ g/ μ l per il 5-Fluorouracile), la loro azione è stata valutata contemporaneamente al silenziamento di CSB, utilizzando la combinazione oligonucleotidica antisenso 7+9+11, che si è rivelata essere la più efficiente tra quelle utilizzate. La lettura allo spettrofotometro è stata condotta 48h dopo il trattamento con i chemioterapici. Le analisi sono state condotte in quadruplicato.

- Mutagenesi sito diretta

E' stata effettuata una mutagenesi sito diretta in tre siti indipendenti, usando il Kit QuikChange XL Site -Directed Mutagenesi (Stratagene). Come visualizzato in Figura il cDNA del vettore di espressione codificante per la proteina CSB wt è stato modificato nella posizione nucleotidica 3249 (da A a G) , 3255 (T a G) e 3262 (A a G) .

- Saggio di proliferazione cellulare

Le cellule sono state seminate nelle piastre 6 well ed il giorno dopo è stata effettuata la trasfezione con oligonucleotidi senso o antisenso. Oltre ai punti sperimentali, sono stati seminati anche due pozzetti, nelle piastre six well, che saranno utilizzati per effettuare una conta cellulare il cui scopo sarà quello di determinare il tasso di proliferazione dalla semina al momento antecedente la trasfezione. Il saggio di proliferazione cellulare è stato condotto mediante una conta effettuata utilizzando una camera di Burker, ad intervalli di 24, 48 e 72 h dopo la trasfezione . Dopo la

rimozione del terreno di trasfezione, le cellule sono state staccate dalla piastra utilizzando l'enzima proteolitico tripsina. Le cellule sono state contate con lo strumento Nucleo Counter NC-100 (Chemometec). L'analisi è stata condotta in triplicato.

- Analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria bivariata

Per questo tipo di analisi sono state seminate 1×10^5 cellule nelle piastre six well, ed il giorno dopo, i vari campioni sono stati trattati con gli oligonucleotidi senso o antisenso. 48 h dopo la trasfezione abbiamo esposto le cellule ad un *pulse* di BrdUrd (stock 4500 μ M) diluendo la soluzione madre 1:100. Le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37° C e fissate poi con metanolo (conservato a -20° C). Le cellule sono state conservate per qualche giorno alla temperatura di 4° C. Nel momento in cui è stata effettuata l'analisi al citofluorimetro, ciascun tubo *falcon* contenente la sospensione cellulare è stato centrifugato; è stato aspirato il supernatante ed aggiunti al pellet 3ml di PBS Tween 20 allo 0.5% per effettuare dei lavaggi. Successivamente, per rimuovere il PBS è stata effettuata un'ultima centrifuga e il pellet è stato risospeso in 1 ml di HCl 3N per denaturare il DNA e permetterne, in seguito, il legame con l'anticorpo anti-bromodeossiridina; ogni *falcon* è stato incubato per 45 minuti a temperatura ambiente.

Allo scadere dei 45 minuti, sono stati aggiunti 4 ml di Tetraborato Sodico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0.1 M ad ogni campione; questo sale permette la neutralizzazione dell'HCl precedentemente utilizzato. In seguito, sono stati effettuati due lavaggi con PBS Tween 20 allo 0.5% ed al pellet precipitato mediante centrifugazione, sono stati aggiunti 100 μ l di anticorpo primario anti-BrdUrd (mouse Dako cod. MO744 diluizione 1:50 preparato in PBS al 10% di goat serum) e sono stati attesi 60 minuti al buio, a temperatura ambiente. Al termine dei 60 minuti sono stati effettuati altri due lavaggi e dopo l'ultima centrifuga sono stati aggiunti al pellet 100 μ l di anticorpo secondario anti-mouse Fluoresceinato (Alexa Fluor 488 Invitrogen cod. A-11017 diluizione 1:600 in PBS al 10% di goat serum); quest'ultimo è stato lasciato agire per 45 minuti al buio a temperatura ambiente. Al termine dei 45 minuti sono stati effettuati due lavaggi con PBS Tween 20 allo 0.5% e dopo l'ultima centrifuga è stato sospeso il pellet in 700 μ l di una soluzione costituita da 690 μ l di PBS+10 μ l di Ioduro di Propidio (soluzione madre 1mg/ml). Il tutto è stato trasferito in delle

provette apposite per leggere i campioni al citofluorimetro (Becman Coulter EPICS XL). I risultati sono stati analizzati grazie all'utilizzo del software WinMDI. Tutte le centrifughe sono state effettuate per 7 minuti a 1500 rpm.

- Retrotrascrizione e qRT-PCR delle cellule silenziate in maniera stabile per CSB

In questa analisi l'mRNA è stato isolato dai vari campioni usando il kit di estrazione NucleoSpin RNA II (M-Medical) 12 h dopo la trasfezione con oligonucleotidi senso o antisenso; il cDNA è stato sintetizzato utilizzando il kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). È stato utilizzato 1 µg di RNA totale per effettuare la sintesi di cDNA per ogni campione. Per la quantificazione dell'mRNA presente nei campioni, ci siamo avvalsi della tecnica di qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase PCR), che rispetto alla PCR tradizionale permette di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza di DNA, all'interno di un campione biologico. Per le analisi di qRT-PCR è stato utilizzato lo strumento LC480 (Roche).

Il volume finale di ciascuna reazione di amplificazione è di 25 µl.

Reazione per l'amplificazione del mRNA codificante per l'actina (normalizzatore):

- 12.5 µl Master mix (2x) (Promega);
- 1 µl Primer forward actina (stock 100 pm), sequenza 5'-CGT TGC CTG TGT TTA AGC-3';
- 1 µl Primer reverse actina (stock 100 pm) 5'-CTG ACT TCA TTC TCC GCA GTA-3';
- 5,5 µl H₂O "RNase e DNase free";
- 5 µl di cDNA.

Reazione per l'amplificazione del mRNA codificante per CSB:

- 12.5 µl Master mix (2x) (Promega)
- 1 µl Primer forward CSB (stock 100 pm) 5'-CAC CAT TGG CAA TGA GCG GTT-3'
- 1 µl Primer reverse CSB (stock 100 pm) 5'-AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG-3'
- 5,5 µl H₂O "RNase e DNase free"
- 5 µl di cDNA.

Il programma di temperature utilizzato è stato il seguente:

- 10 minuti a 95 °C per l'attivazione della Taq Polimerasi;
- 30 secondi a 95 °C per la denaturazione del DNA;
- 1 minuto a 58 °C per l'appaiamento dei primer
- 30 secondi a 72 °C per la fase di estensione.

Dopo la reazione di amplificazione, abbiamo inserito nel programma un ciclo finale di denaturazione dei prodotti amplificati: 1 minuto a 95 °C per la denaturazione, 30 secondi a 55 °C, temperatura alla quale i filamenti complementari si riassociano e una fase finale di aumento graduale delle temperature fino a 95 °C. Man mano che la temperatura aumenta viene rilevata la fluorescenza che risulta essere massima a 55 °C, per poi decadere progressivamente fino al valore corrispondente alla temperatura di melting per il dato prodotto di amplificazione. Il risultato ottenuto è una curva di dissociazione che riflette la composizione in basi e la lunghezza dell'amplificato, parametri questi che determinano la temperatura di melting stessa. Questa fase finale ci permette di verificare se la reazione di RT-PCR ha prodotto un unico tipo di amplificato per il set di primer utilizzati.

- Saggio apoptotico di tipo morfologico

Per questo tipo di analisi è stata utilizzata una combinazione di Fluoresceina diacetato (FDA concentrazione finale 15 µg/ml), Ioduro di propidio (PI concentrazione 5 µg/ml) e Hoechst (HO concentrazione finale 2 µg/ml). L'FDA e l'HO sono dei coloranti vitali che colorano il citoplasma ed il nucleo delle cellule vitali, rispettivamente. Le cellule in necrosi o nella fase tardiva apoptotica sono identificate tramite il PI. Le cellule nella fase precoce e tardiva dell'apoptosi mostrano la caratteristica della cromatina frammentata.

È stata preparata una soluzione stock 50x dei tre fluorocromi ed addizionati 10 µl di questa soluzione a 500 µl di sospensione cellulare (FDA concentrazione finale 15 µg/ml; PI concentrazione finale 5 µg/ml; HO concentrazione finale 2 µg/ml). La eppendorf contenente la sospensione cellulare ed i tre fluorocromi è stata incubata al buio per 5 minuti a 37 °C. Allo scadere del tempo 20 µl della sospensione sono stati seminati su un vetrino e letti al microscopio confocale (emissione PI 615 nm,

494 nm FDA e 350 nm HO). Approssimativamente, 2000 cellule scelte casualmenet sono state analizzate al microscopio per determinare i livelli di morte cellulare.

- Analisi microarray

L'esperimento è stato effettuato in triplicato: sono state effettuate, cioè, tre trasfezioni indipendenti per ogni campione trattato e non.

L'estrazione dell' RNA totale proveniente da tre diversi controlli (campione non trattato, campione trattato con il solo trasfettante e campione trattato con trasfettante più oligonucleotide senso) e dalle cellule silenziate per CSB (trattate con trasfettante più oligonucleotide antisenso) è stata effettuata a 6 e a 12 h dopo la trasfezione mediante il kit Absolutely RNA Miniprep (Agilent Technologies). L'RNA è stato eluito in 30 µl di *elution buffer*. La qualità e l'integrità di ciascun campione di RNA sono state valutate mediante l'utilizzo dello strumento Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent RNA 6000 nano kit): campioni con un RIN (*RNA Integrity Number*), indice di integrità dell'RNA, più basso di 8.0 sono stati scartati. Due aliquote di RNA delle tre originarie sono state così selezionate per ibridare il Chip dei microarray, in maniera tale da ricavare i dati da due trasfezioni indipendenti, così da ridurre la variabilità sperimentale.

Tutti gli step sperimentali cha hanno coinvolto marcatura, ibridazione e lavaggi dei campioni sono stati effettuati seguendo il protocollo dell' Agilent Technologies (<http://chem.agilent.com>).

Il profilo di espressione genica è stato ottenuto utilizzando il protocollo a singolo colore dell'Agilent Technologies (http://chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G414090040_GeneExpression_OneColor_6.7.pdf).

Il cRNA marcato con Cy3 è stato ibridato sul microarray contenente l'intero genoma umano Agilent SurePrint G3 8x60K. Dopo l'ibridazione, l'acquisizione dell'immagine è stata compiuta utilizzando lo scanner Agilent G2564B. L'immagine è stata analizzata mediante l'utilizzo del software Agilent Feature Extraction. I dati sono stati filtrati utilizzando il software Microsoft Excel, scartando gli spot che mostravano un livello di intensità vicino al background. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando i software Agilent GeneSpring GX, MeV (TIGR) e Microsoft Excel. Ogni array è stato normalizzato utilizzando l'algoritmo Lowess. Gli mRNA

differenzialmente espressi sono stati identificati con i software ANOVA e SAM. I *pathway* modulati differenzialmente sono stati analizzati principalmente utilizzando il Panther tool. Strumenti addizionali utilizzati includono DAVID, Gostat e Pathway-express. Il *clustering* gerarchico (HCL) è stato utilizzato per valutare le differenze tra i profili trascrizionali dei campioni.

- Analisi qRT-PCR dei dati ottenuti mediante microarray

Per confermare i dati ottenuti dall'analisi microarray abbiamo estratto l'RNA 6 e 12h dopo la trasfezione transiente con oligonucleotidi senso e antisenso utilizzando il kit di estrazione Absolutely RNA Miniprep (Agilent Technologies). L'mRNA è stato eluito in 30 µl di *elution buffer*. Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di mRNA, utilizzando il kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas); come primer abbiamo utilizzato oligo(dT)₁₈.

Ogni campione (non trattato, trattato con trasfettante, trattato con trasfettante + DNA senso e trattato con trasfettante + DNA antisenso) è stato amplificato per tutti i geni che abbiamo selezionato dai dati di microarray e per i geni ACTB (β -actina) e HPRT1 (ipoxantina fosforibosil-trasferasi 1), utilizzati come normalizzatori. Inoltre, sono state amplificate anche le forme *spliced*, *unspliced* e *total* (*spliced* + *unspliced*) dell'mRNA del gene XBP1. Per questo esperimento, i primer sono stati ingegnerizzati in modo tale che il primer reverse legghi l'mRNA di XBP1 a valle del sito di *splicing* così da permettere l'amplificazione di tutte e tre le forme. I primer forward invece permettono di discriminare tra le tre forme di mRNA: un primer lega la sequenza a cavallo tra l'introne eliminato e l'esone adiacente, così da permettere l'amplificazione della forma *unspliced*; un primer lega per metà il 3' e per metà il 5' dei due esoni che vengono legati insieme in seguito all'eliminazione dell'introne, così da permettere l'amplificazione della forma *spliced*; un altro primer, infine, lega una regione a monte rispetto al sito di *splicing*, in modo tale da permettere l'amplificazione sia la forma *spliced* che quella *unspliced*. Tutte le analisi di qRT-PCR sono state effettuate in duplicato.

Il volume finale di ciascuna reazione di amplificazione è di 25 µl. La mix di reazione di amplificazione è costituita da:

- 12,5 µl Master mix 2X (Promega)
- 1 µl Primer forward (stock 100 pM)
- 1 µl Primer reverse (stock 100 pM)
- 5,5 µl H₂O RNase & Dnase free
- 5 µl cDNA

Il programma di temperature utilizzato per l'amplificazione è stato il seguente:

- 10 minuti a 95°C per l'attivazione della Taq Polimerasi
 - 30 secondi a 95°C per la denaturazione del DNA
 - 1 minuto a 58°C per l'appaiamento dei primer
 - 30 secondi a 72°C per la fase di estensione
- } 40 cicli

Dopo la reazione di amplificazione, abbiamo inserito nel programma un ciclo finale di denaturazione dei prodotti amplificati:

- 1 minuto a 95°C per la denaturazione
- 30 secondi a 55°C, temperatura alla quale i filamenti complementari si riassociano
- Fase finale di aumento graduale della temperatura fino a 95°C.

- Silenziamento stabile della proteina CSB mediante *short harpin* in cellule HeLa

Per effettuare il silenziamento stabile del gene CSB, cellule HeLa in fase di crescita esponenziale sono state trasdotte con particelle lentivirali contenenti tre costrutti specifici che codificano per una sequenza di RNA *short harpin* (shRNA) disegnata per legarsi in precisi punti dell'mRNA di CSB (Santa Cruz Biotechnology). Questo legame attiva all'interno della cellula il meccanismo della *RNA interference*, che porta alla degradazione dell'mRNA di CSB, e quindi allo spegnimento del gene. Come controllo sono state trasdotte cellule HeLa con particelle lentivirali contenente un costrutto codificante per un shRNA che non bersaglia nessun gene. Il genoma virale si integra casualmente all'interno del genoma della cellula ospite e sfrutta il macchinario trascrizionale di quest'ultima per trascrivere la molecola di shRNA. Le cellule trasdotte vengono selezionate aggiungendo al terreno l'antibiotico Puromicina (stock 10 mg/ml).

Nel nostro caso, sono state effettuate tre trasduzioni sia per quanto riguarda le particelle lentivirali contenente l'shRNA che bersaglia il gene CSB, sia per quanto riguarda le particelle lentivirali di controllo. La selezione è avvenuta utilizzando concentrazioni crescenti di Puromicina, sia per il campione, che per il controllo: 2 µg/ml, 5 µg/ml e 10 µg/ml. Questo è stato effettuato con l'obiettivo, poi, di valutare a quale concentrazione di Puromicina abbiamo il maggior numero di cellule silenziate per CSB.

Il protocollo che abbiamo utilizzato per la trasduzione con particelle lentivirali prevede:

Giorno 1

Sono state seminate 50000 cellule nelle piastre 6-well il giorno prima dell'infezione virale.

Sono stati aggiunti 2 ml di terreno senza antibiotici e le cellule sono state incubate o.n. a 37°C al 5% di CO₂. Il giorno seguente, per effettuare la trasduzione, le cellule devono essere intorno al 50-70% di confluenza.

Giorno 2

È stata preparata una mix di terreno senza antibiotici contenente *Polybrene** ad una concentrazione finale di 5 µg/ml (1 µl di *Polybrene* in 2 ml di terreno).

È stato rimosso il terreno dalla 6-well, fatto un lavaggio in PBS e sono stati aggiunti i 2 ml di mix terreno/*Polybrene*.

Una piccola parte della mix terreno/*Polybrene* è stata usata per prelevare il lentivirus contenuto in una eppendorf.

Una volta mischiata gentilmente, la mix terreno/*Polybrene*/lentivirus è stata aggiunta goccia a goccia alle cellule.

Le cellule sono state incubate *overnight*.

*Il *Polybrene* è un policatione che neutralizza le interazioni cariche aumentando il legame tra il capsido pseudo-virale e la membrana cellulare.

Giorno 3

È stato rimosso il terreno di coltura e sono stati aggiunti 2 ml di terreno completo (senza *Polybrene*).

Giorno 4

Le cellule sono state *splittate* 1:3 e incubate in un terreno completo per 24 h.

Giorni seguenti

Le cellule trasdotte sono state selezionate aggiungendo l'antibiotico Puromicina al terreno di coltura ad una concentrazione finale di 2, 5 e 10 µg/ml.

- Saggio di proliferazione utilizzando induttori dell'ER stress

Con questo saggio abbiamo valutato l'effetto di sostanze chimiche che inducono l'ER *stress* sulla proliferazione delle cellule HeLa silenziate per CSB rispetto al controllo. Le sostanze utilizzate sono la *Tunicamicina* e il *Ditiotreitolo* (DTT). La *Tunicamicina* è un antibiotico prodotto da *Streptomyces lysosuperificus*, inibitore della N-acetilglucosamina-fosfato transferasi, che catalizza la N-glicosilazione delle proteine attraverso il trasferimento di unità di N-acetilglucosamina al dolicolo-1-fosfato nella prima tappa della biosintesi dell'oligosaccaride-P-P-dolicolo. Molte delle proteine sintetizzate a livello del reticolo endoplasmatico vengono N-glicosilate e la N-glicosilazione, spesso, è fondamentale per un corretto *folding*. Per questo, sostanze chimiche, come la *Tunicamicina*, che alterano la N-glicosilazione sono in grado di indurre ER *stress*. Il *DTT*, invece, è un forte agente riducente. Il lume del reticolo endoplasmatico è un ambiente altamente ossidante, questo per permettere alle proteine sintetizzate di formare ponti disolfuro inter- e intra-molecolari tra i residui di cisteina. Visto che la formazione dei ponti disolfuro è importante per il folding delle proteine secretorie, agenti riducenti che distruggono i ponti disolfuro, come il DTT (*Ditiotreitolo*), inducono ER *stress*.

Per il saggio sono state seminate 182000 cellule HeLa sh-K e sh-CSB selezionate a 10 µg/ml in fiasche da 25 cm². Il giorno dopo la semina le cellule sono state trattate con gli induttori dell'ER *stress*. Per quanto riguarda la *Tunicamicina* (stock 100 µg/ml) abbiamo utilizzato le dosi di 2, 5 e 10 µg/ml. Come controlli, visto che la sostanza è sciolta in DMSO, abbiamo utilizzato volumi di DMSO corrispondenti a

quelli della *Tunicamicina*. Per quanto riguarda il DTT (stock 100 mM), invece, abbiamo utilizzato le dosi di 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 mM. In questo caso, visto che il DTT è sciolto in acqua, abbiamo considerato un unico controllo utilizzando un volume di H₂O corrispondente alla dose massima di DTT. Tutte le sostanze sono state aggiunte al terreno, per un volume finale di 4 ml.

Le cellule sono state incubate con gli induttori dell'ER *stress* a 37°C e 5% di CO₂ per 8 ore, al termine delle quali il terreno contenente le sostanze è stato eliminato e sostituito con normale terreno completo.

Il giorno seguente, le cellule sono state contate utilizzando la camera di Burkner. Per far questo, inizialmente è stato aspirato il terreno. Dopo due lavaggi in PBS, le cellule sono state staccate dalle fiasche utilizzando l'enzima proteolitico tripsina. Una volta recuperate le cellule, le cellule sono state contate con lo strumento Nucleo Counter NC-100 (Chemometec). Ogni valore del numero di cellule relativo ad una specifica dose è stato normalizzato rapportandolo al numero di cellule relativo al controllo corrispondente nel caso della *Tunicamicina* e all'unico controllo effettuato nel caso del DTT.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Peter J. R., 2005. *Genetica. Edises*, 18:541-567.
2. Hanahan D., Weinberg RA., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell Review*, 100: 57–70.
3. Chabner BA, Roberts T.Jr., 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews*, 5: 65-72.
4. Laurence HH., 2002. DNA and its associated process as targets for cancer therapy. *Nature Reviews*, 8: 193-204.
5. Kelland L., 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews*, 7: 573-584.
6. Chen J., Stubbe J., 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature Reviews*, 5: 102-112.
7. Pommier Y., 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews*, 6: 789-802.
8. Calvert H., Judson I., Van der Vijgh WJ., 1993. Platinum complexes in cancer medicine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to toxicity and therapeutic activity. *Cancer Surv*, 17: 189-217.
9. Gottesman M., 2002. Mechanism of cancer drug resistance. *Annual Review of medicine*, 53:615-627.
10. Ross JS., Slodkowska EA., 2009. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist*, 14: 4 320-368.
11. Weinstein B., 2002. Addiction to oncogenes-the Achilles heel of cancer. *Science*, 297: 63-64.
12. Lowe S., Cepero E., Evan G., 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432: 307-315.
13. Alain J.G., Citterio E., Rademakers S., Van Os R., Vermeulen W., Constantinou A., Egly JM., Bootsma D., Hoeijmakers H.J., 1997. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II- containing complex. *Embo Journal*, 19:5955-5965
14. Filippi S., Latini P., 2008. CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response. *Embo Journal*, 27:2545–2556 .

15. Licht CL., Stevnsner T., 2003. Cockayne Syndrome Group B Cellular and Biochemical Functions. *Am. J. Hum. Genet.*, 73:1217-1239.
16. Weidenheim KM., Dickson DW., Rapin I., 2009. Neuropathology of Cockayne syndrome: evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration. *Mechanisms of Aging and Development*, 130: 619-636.
17. Nakazawa Y., Yamashita S., Lehmann AR., Ogi T., 2010. Asemi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair*, 9:506–516.
18. Laine JP., Egly JM., 2006. When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet.*, 22:430-436.
19. Selby CP., Sancar A., 1997. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 94: 11205-11209.
20. Bradsher J., Auriol J., Proietti de Santis L., 2002. CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol cell* 10: 819-829.
21. Yuan X., Feng W., Imhof A., Grummt I., Zhou Y., 2007. Activation of RNA polymerase I transcription by Cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell*, 27: 585–595.
22. Ciaffardini F., Nicolai S., Caputo M., Canu G., Paccosi E., Costantino M., Frontini M., Balajee AS., Proietti De Santis L., 2014. The cockayne syndrome B protein is essential for neuronal differentiation and neuritogenesis. *Cell Death Dis*, 5: e1268.
23. Mellon I., Spivak G., Hanawalt PC., 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of mammalian *DHFR* gene. *Cell*, 51: 241-249.
24. Ljungman M., 2000. Dial 9-1-1 for p53: mechanism of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*, 2:208-225.
25. Selby CP., Sancar A., 1993. Molecular mechanism of transcription repair coupling. *Science*, 260: 53-58.
26. Ljungman M., Lane DP., 2004. Transcription-guarding the genome by sensing DNA damage. *Nature*, 4: 727-737.
27. Latini P., Frontini M., Caputo M., 2011. CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle*, 10:3719-3730.

28. Albrechtsen N., Dornreiter I., 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, 18:7706-7717.
29. Liu Y., Kulesz-M., 2001. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence specific DNA binding. *Carcinogenesis*, 22:851-860.
30. Lill NL., Grossman SR., 1997. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*, 387: 823-827.
31. Frontini M., Proietti De-Santis L., 2012. Interaction between the Cockayne syndrome B and p53 protein: implications of aging. *Aging*, 4: 89-87.
32. Pugh CW., Ratcliffe PJ. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9:677-684.
33. Pan Y., Oprysko PR., Asham AM., Koch CJ., 2004. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment. *Oncogene*, 23: 4975–4983.
34. Shen C., Nettleton D., 2005. Roles of the HIF-1 Hypoxia-inducible Factor during Hypoxia Response in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological chemistry*, 280: 20580–20588.
35. Frontini M., Proietti De-Santis L., (2009). Cockayne Syndrome B protein (CSB): Linking p53, HIF-1 and p300 to robustness, lifespan, cancer and cell fate decisions. *Cell Cycle*, 8: 693–696.
36. Caputo M., Frontini M., Velez-Cruz R., Nicolai S., Prantera G., Proietti De-Santis L., (2013). The CSB repair factor is overexpressed in cancer cells, increases apoptotic resistance, and promotes tumor growth. *DNA Repair*, 12: 293– 299.
37. Balajee AS., Proietti-De-Santis L., Brosh RM., Selzer R., Bohr VA., (2000) Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis. *Oncogene*, 19 477–489.
38. Fujiwara T., Grimm EA., 1994. Gene therapeutics and gene therapy for cancer. *Curr Opin Oncol*, 6:96-105.
39. Dean MN., Cooper RS., 2000. La farmacologia degli oligonucleotidi antisenso *Journal of Clinical Ligand Assay*, 23:43-49.
40. Dean NM., Bennett CF., 2003. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene*, 22:9087-9096.

41. Jansen B., Wittke UZ., 2002. Antisense therapy for cancer- the time of truth. *Lancet Oncol*, 3: 672–83.
42. Stahel RA., Wittke UZ., 2003. Antisense oligonucleotides for cancer therapy – an overview. *Lung Cancer*, 41:81-88.
43. Mitsuhashi M., 1997. Strategy for designing specific antisense oligonucleotide sequence. *Journal of Gastroenterology*, 32:282-287.
44. Tsai YC., Weissman AM., (2010). The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. *Genes Cancer* 7: 764–778.
45. Marciniak SJ., Yun CY., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding HP., Ron D., (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 18: 3066–3077.
46. Schroder M., Kaufman RJ., (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.
47. Ma Y., Brewer JW., Diehl JA., Hendershot LM., (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318: 1351-1365.
48. Ma, Y., Hendershot, L. M., 2004. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem neuroanat* 28:51-65.
49. Kaufman RJ., (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13(10): 1211-1233.
50. Scheuner D., Song B., McEwen E., Liu C., Laybutt R., Gillespie P., Saunders T., Bonner-Weir S., Kaufman RJ., (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and *in vivo* glucose homeostasis. *Mol. Cell* 7: 1165–1176.
51. Harding HP., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D., (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6: 1099–1108.
52. Yaman I., Fernandez J., Liu H., Caprara M., Komar AA., Koromilas AE., Zhou L., Snider MD., Scheuner D., Kaufman RJ., Hatzoglou M., (2003). The

- zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 113: 519–531.
53. Palam LR., Baird TD., Wek RC., (2011). Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J. Biol. Chem.* 286: 10939–10949.
 54. Marciniak SJ., Yun CY., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding HP., Ron D., (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18: 3066–3077.
 55. Song B., Scheuner D., Ron D., Pennathur S., Kaufman RJ., (2008). Chop deletion reduces oxidative stress, improves β cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* 118: 3378–3389.
 56. Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K., (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107: 881–891.
 57. Calton M., Zeng H., Urano F., Till JH., Hubbard SR., Harding HP., Clark SG., Ron D., (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415: 92–96.
 58. Lee K., Tirasophon W., Shen X., Michalak M., Prywes R., Okada T., Yoshida H., Mori K., Kaufman RJ., (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 16: 452–466.
 59. Lin JH., Li H., Yasumura D., Cohen HR., Zhang C., Panning B., Shokat K. M., Lavail MM., Walter P., (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318: 944–949.
 60. Shaffer AL., Shapiro-Shelef M., Iwakoshi NN., Lee AH., Qian SB., Zhao H., Yu X., Yang L., Tan BK., Rosenwald A., Hurt EM., Petroulakis E., Sonenberg N., Yewdell J. W., Calame K., Glimcher LH., Staudt LM., (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21: 81–93.
 61. Guo FJ., Liu Y., Zhou J., Luo S., Zhao W., Li X., Liu C., (2012). XBP1S protects cells from ER stress-induced apoptosis through Erk1/2 signaling pathway involving CHOP. *Histochem. Cell Biol.* 138: 447–460.

62. Ye J., Rawson RB., Komuro R., Chen X., Davé UP., Prywes R., Brown MS., Goldstein JL., (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6: 1355–1364.
63. Chen X., Shen J., Prywes R., (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 277: 13045–13052.
64. Schroder M., Kaufman RJ., (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.
65. Yoshida H., Okada T., Haze K., Yanagi H., Yura T., Negishi M., Mori K., (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20: 6755-6767.
66. Ma Y., Brewer JW., Diehl JA., Hendershot LM., (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318: 1351-1365.
67. Ron D., Habener JF., (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAO and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6: 439-453.
68. Brush MH., Weiser DC., Shenolikar S., (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 23: 1292-1303.
69. Hussain SG., Ramaiah KV., (2007). Reduced eIF2 α phosphorylation and increases proapoptotic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 37: 355-365.
70. McCullough KD., Martindale JL., Klotz LO., Aw TY., Holbrook NJ., (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1249–1259.
71. Puthalakath H., O'Reilly LA., Gunn P., Lee L., Kelly PN., Huntington ND., Hughes PD., Michalak EM., McKimm-Breschkin J., Motoyama N., Gotoh T., Akira S., Bouillet P., Strasser A., 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129: 1337–1349.

72. Szegezdi E., Logue SE., Gorman AM., Samali A., (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7: 880–885.
73. Galehdar Z., Swan P., Fuerth B., Callaghan SM., Park DS., Cregan SP., (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J. Neurosci.* 30: 16938–16948.
74. Hsin IL., Hsiao YC., Wu MF., Jan MS., Tang SC., Lin YW., Hsu CP., Ko JL., (2012). Lipocalin 2, a new GADD153 target gene, as an apoptosis inducer of endoplasmic reticulum stress in lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263: 330–337.
75. Harris AL., (2002). Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2: 38–47.
76. Hanahan D., Weinberg RA., (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 647–674.
77. Wilson WR., Hay MP., (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 6: 393–410.
78. Cross D., Burmester JK., 2006. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research* 4: 218-227.
79. Stubbert LJ., Smith JM., McKay BC., (2010). Decreased transcription-coupled nucleotide excision repair capacity is associated with increased p53- and MLH1-independent apoptosis in response to cisplatin. *BMC Cancer* 10: 207.
80. Nicolai S., Filippi S., Caputo M., Cipak L., Csaszar E., Ammerer G., Gregan J., Frontini M., Willems D., Balajee AS., Proietti-De-Santis L., (2015). Identification of novel proteins co-purifying with Cockayne syndrome group B (CSB) reveals possible roles for CSB in RNA metabolism and chromatin dynamics. *In fase di pubblicazione sulla rivista Plos One.*
81. Raychaudhuri S., Loew C., Körner R., Pinkert S., Theis M., Hayer-Hartl M., Buchholz F., Hartl FU., (2014). Interplay of acetyltransferase EP300 and the proteasome system in regulating heat shock transcription factor 1. *Cell* 156: 975-85.