



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOLOGIA E MEDICINA DELLA
RIGENERAZIONE
INDIRIZZO: ENDOCRINOLOGIA COMPARATA
CICLO XXI

**CONTROLLO TRASCRIZIONALE DELL'ENZIMA STEROIDE
SOLFATASI
IN TESSUTI UMANI SANI E TUMORALI**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore : Dott.ssa Luisa Dalla Valle

Dottoranda : Dott.ssa Alessia Nardi

INDICE

INDICE	1
RIASSUNTO	3
ABSTRACT	7
OBIETTIVO	11
1. Una visione d'insieme.....	13
2. La reazione di solfatazione e l'enzima STS nella steroidogenesi.....	13
3. Arilsolfatasi.....	15
4. Biologia molecolare del gene della steroide solfatasi.....	17
5. Struttura e meccanismo d'azione della STS	19
6. Il gene dell'STS sfugge all'inattivazione del cromosoma X	22
7. Localizzazione dell'enzima STS.....	23
8. Ruolo biologico della STS	24
9. Regolazione dell'attività della STS.....	28
10. Patologia e STS.....	29
11. Regolazione dell'espressione genica data dall'uso di promotori alternativi	35
MATERIALI E METODI.....	39
12. Campioni analizzati.....	39
13. Estrazione dell'RNA totale	41
13.1. Purificazione dell'RNA totale estratto	42
13.2. Controllo della qualità dell'RNA mediante gel elettroforesi	43
13.3. Quantificazione dell'RNA	43
14. Trascrizione inversa dell'RNA con <i>random</i> esameri	44
15. Trascrizione inversa con <i>primer</i> RT specifici	45
16. Amplificazione del DNA mediante PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	46
17. Analisi dei prodotti di amplificazione mediante separazione in gel di agarosio	48
18. Amplificazione rapida della porzione terminale al 5' del cDNA mediata da ligasi: 5' RLM-RACE	50
18.1. Trattamento con CIP (fosfatasi alcalina di vitello)	51
18.2. Trattamento con TAP (pirofosfatasi acida di tabacco).....	52
18.3. Ligazione dell'adattatore al 5'	52

INDICE

18.4.	Reazione di retrotrascrizione	53
18.5.	Prima PCR	53
19.	Estrazione e purificazione del DNA da gel d'agarosio.....	54
20.	Quantificazione in gel di agarosio	54
21.	Sequenziamento del DNA	55
22.	Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA).....	55
	RISULTATI	63
23.	Estrazione dell'RNA totale e verifica dell'espressione del gene STS.....	64
24.	5'-RLM-RACE dei trascritti di mRNA isolati	65
25.	Trascritto 1.....	68
26.	Trascritto 2 e 3	69
27.	Trascritto 4.....	70
28.	Trascritto 5.....	71
29.	Trascritto 6.....	71
30.	Trascritto 7.....	72
31.	Trascritto 8.....	72
32.	Analisi preliminare delle regioni promotrici	73
33.	Confronto tra tessuti sani e tumorali.....	75
34.	Regione N-terminale della proteina STS tradotta a partire da trascritti diversi	76
35.	Messa a punto della metodica MLPA per l'analisi delle varianti trascrizionali del gene STS	77
35.1.	Prima prova: verifica delle lunghezze degli amplificati.....	79
35.2.	Seconda prova: confronto tra retrotrascrizione con <i>random</i> esanucleotidi e con <i>primer</i> specifici	80
35.3.	Terza prova: DQ <i>control</i>	83
36.	Analisi finale dei campioni.....	85
37.	Analisi mediante RT-PCR.....	88
	DISCUSSIONE	91
	BIBLIOGRAFIA	97
	APPENDICE	103
	Pubblicazioni	105

RIASSUNTO

INTRODUZIONE: L'enzima steroide solfatasi (STS) promuove la reazione di idrolisi degli ormoni steroidei coniugati al solfato come il deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) e l'estrone solfato (E1-S) permettendo la formazione di composti ormonalmente attivi. L'attività di questo enzima, oltre a rivestire una funzione fondamentale nei meccanismi di comunicazione cellulare, assume una grande importanza nell'ambito dei tumori ormono-dipendenti nei quali è stato rilevato un incremento dei suoi livelli di espressione rispetto alla controparte sana; inoltre, in questi, rappresenta la via maggiormente utilizzata per la sintesi degli estrogeni promuoventi la proliferazione di tumori estrogeno-dipendenti. E' stato anche dimostrato come agli alti livelli di espressione del messaggero dell'STS in tessuti tumorali sia associata una cattiva prognosi per il tumore alla mammella in donne sia in pre- che in post-menopausa.

Il gene della steroide solfatasi umana è localizzato nel braccio corto del cromosoma X e mappa precisamente nella regione Xp22.3-Xpter assieme al cluster di altre tre solfatasi: ARSD, ARSE, ARSF che sono comprese in un totale di 200 kb di DNA.

La struttura del gene umano, come riportato da studi eseguiti sul trascritto isolato dalla placenta, consiste di 10 esoni, intervallati da introni di diversa lunghezza, che variano da 102 pb a 35 kb, per un totale di 146 kb. La regione promotrice risulta essere inusuale in quanto manca del TATA box, non possiede isole ricche in GC e risulta difettiva anche di regioni di ancoraggio per il fattore Sp1 e per altri fattori di trascrizione noti. Non possiede cioè strutture o elementi associati a molti promotori eucariotici.

Come spesso succede per geni privi di TATA box, l'enzima possiede più siti di inizio della trascrizione. Il cDNA per l'enzima STS codifica per una proteina di 583 amminoacidi del peso di 63 kDa, dotata di un peptide segnale di 21-23 amminoacidi che viene tagliato dopo la traduzione per produrre una proteina matura costituita da 560 amminoacidi.

PREMESSA: Recenti evidenze hanno messo in luce come l'espressione di tale gene sia probabilmente regolata in modo tessuto-specifico, mediante l'utilizzo di primi esoni non tradotti alternativi, associati a promotori diversi e

presumibilmente controllati da fattori trascrizionali differenti. Mediante la tecnica di RLM-RACE abbiamo voluto studiare la regione 5'-terminale dei messengeri codificanti l'enzima STS in diversi tessuti umani, sia sani che tumorali, allo scopo di verificare questo tipo di controllo della trascrizione e di descriverne i componenti.

RISULTATI: In questi tre anni di dottorato siamo riusciti ad identificare otto trascritti alternativi, operanti su tessuti umani diversi.

Il trascritto 1, quello placentare, presenta un primo esone di 216 b chiamato esone 1a in quanto corrispondente a quello del trascritto riportato per primo in letteratura. Esso è separato dall'esone 2 dalla presenza di un introne di 33,5 kb ed potrebbe essere parzialmente tradotto nei primi tre amminoacidi della proteina codificata, in quanto presenta un codone di inizio traduzione (ATG) a partire dalle ultime 11 pb. Il trascritto 1 è stato riscontrato in placenta, colon e polmone sano. L'esone 2 è comune a tutte le varianti trascrizionali individuate; presenta una lunghezza di 141 b e un sito alternativo di inizio della traduzione, in frame con quello identificato nell'esone 1a, dopo 4 nt dall'inizio dell'esone stesso.

I trascritti 2 e 3, sono i trascritti maggiormente utilizzati nei tessuti umani da noi analizzati; sono infatti espressi in molti tessuti dove utilizzano siti di inizio della trascrizione (TSS) diversi. Questi trascritti sono costituiti rispettivamente da due primi esoni non codificanti, esone 0a ed esone 0b. Entrambi fanno splicing con un secondo esone di 129 b (esone 1b) dal quale sono separati da un introne di 43,3 kb e da un introne di 42,8 kb rispettivamente. A livello dell'esone 1b si trova un possibile codone di inizio della traduzione (dopo le prime 97 b).

Il trascritto 4 contiene un primo esone non tradotto, esone 0c, di 341 b ed è separato dall'esone 1b da un introne di 30,8 kb. La sua espressione è stata individuata a livello di ovario, di papilla dermica e nella linea cellulare PC3.

Il trascritto 5 viene espresso in tiroide, linfomonociti e in un campione di ovario tumorale e presenta un primo esone non tradotto (esone 1c) lungo rispettivamente: 98, 89 e 153 b nelle tre diverse sedi. Il secondo esone risulta separato dal primo da un introne di 854 b.

Il trascritto 6 è stato individuato in linfociti e contiene un primo esone non tradotto (esone 1d) di 246 b, localizzato 477 nt a monte dell'esone 2.

Il trascritto 7 è stato individuato nell'ovario tumorale. Il trascritto presenta un primo esone non tradotto 0b di 42 b seguito da un introne di 11,82 kb con siti di splicing canonici GT e AG che lo separano dall'esone non tradotto 0c. In questo caso l'esone 0c si estende per 156 b e viene collegato all'esone 1b ed infine all'esone 2.

Il trascritto 8 è stato identificato in una linea cellulare di carcinoma prostatico, PC-3, e presenta un primo esone 0d di 17 b, separato dall'esone 1e lungo 73 b dalla presenza di un introne di 4,8 kb. L'esone 1e è separato dall'esone 2 da un introne di 56,4 kb. L'analisi delle sequenze degli esoni presenti in questo trascritto porta all'ipotesi che sia l'esone 0d che l'esone 1e siano codificanti: le ultime 7 basi dell'esone 0d contengono un ATG in frame con l'esone 1e e l'esone 2.

Da tutto questo si potrebbe ricavare come la presenza di differenti ATG putativi negli esoni 0d, 1a, 1b e 2 possa determinare la traduzione di proteine differenti nella regione N-terminale. Questo non dovrebbe comunque interferire con le caratteristiche cinetiche dell'enzima in quanto la regione N-terminale contiene il peptide segnale, che viene eliminato durante la maturazione della proteina.

Al fine di analizzare da un punto di vista qualitativo e quantitativo l'espressione delle diverse varianti trascrizionali del gene STS è stata scelta una recente metodica, la MLPA ossia *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*. Questa tecnica si propone come possibile alternativa ad altre metodiche già da tempo consolidate come per esempio la Real Time PCR. Una volta trovate quelle che ci sono sembrate le condizioni ottimali per la reazione di RT-MLPA, abbiamo proceduto con l'analisi di tutti i campioni stoccati.

I risultati ottenuti mostrano come l'esone 1a è espresso nel tessuto placentare con livelli davvero elevati. La sua espressione è stata riscontrata anche nel tessuto polmonare sia sano che tumorale, confermando così i risultati della 5'-RACE mentre bassi livelli di espressione si notano inoltre anche a livello di altri tessuti.

L'esone 1c, precedentemente rilevato in tiroide, linfomonociti e ovario tumorale risulta essere espresso, seppur con bassi valori di espressione, in tutti tessuti analizzati eccetto nella cartilagine artrosica della testa femorale.

L'esone 1d e l'esone 1e sono invece espressi, sempre a bassi livelli, in un numero limitato di campioni.

Per quanto riguarda l'esone 1b, abbiamo riscontrato la sua presenza in tutti i tessuti analizzati con valori di espressione variabili. Benché gli esoni 0a, 0b, 0c siano sempre correlati all'esone 1b, abbiamo analizzato anche i loro specifici pattern di espressione dal momento che pensiamo siano guidati da differenti promotori. Il più alto valore di espressione si è riscontrato per l'esone 0b, mentre il più basso per lo 0c.

DISCUSSIONE: La steroido solfatasi, in questi ultimi anni, è stata oggetto di numerosi studi per l'implicazione che la sua attività può avere a livello della comunicazione cellulare e dello sviluppo di tumori ormono-dipendenti. E' stato infatti dimostrato come agli alti livelli di espressione del messaggero dell'STS in tessuti tumorali sia associata una cattiva prognosi per il tumore alla mammella in donne in pre- e post-menopausa.

L'analisi da noi condotta ha potuto mettere in luce la complessità della regolazione dell'espressione del gene STS: siamo riusciti a caratterizzare ben 8 diversi pattern di trascrizione, che potrebbero effettivamente derivare da una regolazione tessuto-specifica. La trascrizione avviene infatti mediante 8 primi esoni alternativi associati a promotori prossimali diversi e di conseguenza probabilmente regolati da differenti fattori trascrizionali. Inoltre tutti i promotori prossimali individuati sono privi di TATA box e quindi presentano siti di inizio della trascrizione variabili.

Per acquisire sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo informazioni sulle varianti trascrizionali dei singoli tessuti abbiamo quindi scelto di utilizzare la tecnica di RT-MLPA che ci ha permesso una visualizzazione veloce e relativamente economica del pattern di espressione di questo gene in un determinato tessuto. I risultati ottenuti sono stati confrontati con i precedenti risultati ottenuti dalle analisi di 5'-RACE e ulteriormente convalidati da analisi di RT-PCR mediante primer specifici. La tecnica ci ha fornito dei risultati soddisfacenti, permettendoci un'immediata identificazione del tipo di promotore utilizzato in un determinato tessuto.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Steroid sulfatase (STS) is a membrane-bound microsomal enzyme that hydrolyzes various alkyl (*e.g.*, dehydroepiandrosterone sulfate) and aryl steroid sulfates (*e.g.*, estrone sulfate, E1-S), leading to the *in situ* formation of biologically active hormones. In malignant breast tissue, STS mRNA expression was found to be significantly higher than in normal tissue, consistently with the higher STS activity detected in pathological samples. This finding suggested that STS could play a significant role in supporting the growth of hormone-dependent tumors and there is now abundant evidence that the hydrolysis of E1-S to estrone (E1) is the main source of estrogens in tumors. Actually, expression of STS has been shown to be a strong prognostic factor for disease-free survival in breast cancer, and in ovarian cell adenocarcinoma.

The human STS gene contains 10 exons, spread over 146 kbp in the short arm of the X chromosome, and maps in the Xp22.3-Xpter position. The deduced amino acid sequence consists of 583 amino acids, including a 21-residue signal peptide. The STS cDNA has been cloned and sequenced from human placenta cDNA libraries. In placental transcripts, the first exon is partially translated and presents 5'-untranslated regions (5'-UTRs) of different lengths, owing to multiple transcription start sites (TSSs) scattered over a 50-bp region. The STS promoter associated with this exon is TATA-less, low in GC content, and lacks binding sites for known transcription factors, though binding of putative factors was detected with the gel mobility shift assay.

AIM OF THE STUDY: The studies on the transcriptional control of STS have demonstrated the possibility of a tissue-specific regulation, as previously found for other steroidogenic enzymes, such as aromatase.

To understand the role of STS variants, I performed a 5'-RLM-RACE on RNA from different normal and cancer tissues in order to explore their expression patterns.

RESULTS: In this Ph.D. thesis, I have characterized eight different transcriptional patterns in different tissues.

The first transcript variant corresponds to that previously found in the placenta and includes a first exon (exon 1a) which is partially translated into the first 3 aa

ABSTRACT

of the placental protein. Exon 1a is separated from exon 2 by an intron of 33.5 kb, Exon 1a was found in placenta, colon and lung tissues. Exon 2 is 141-nt long and occurs in all transcript variants.

Transcript variants 2 and 3 were found in different tissues. They are composed of two untranslated first exons (0a and 0b), spliced to a common exon 1b, 129-nt long. Exon 0a is placed 480 nt upstream of exon 0b, and they are separated from exon 1b by introns of 43.3 and 42.8 kb, respectively.

Transcript variant 4 contains a novel untranslated first exon, exon 0c, spliced to exon 1b after an intron of 30.8 kb, and thus about 12 kb downstream of exons 0a and 0b. This variant was expressed in the PC3 cell line, ovary and in dermal papillae.

Transcript variant 5 was found only in thyroid, mononuclear lymphocytes (MNL) and in a sample of ovarian cancer, and exhibits an untranslated first exon (exon 1c) with lengths of 98, 89 and 153 nt in thyroid, MNL and ovary, respectively. This is spliced directly to exon 2 with an intervening intron of 854 nt.

Transcript variant 6 was found only in MNL and is characterized by another untranslated first exon (exon 1d) of 246 nt, located 477 nt upstream of exon 2.

The transcript variant 7 was found in ovarian cancer. It is composed of the untranslated exon 0b, spliced to exon 0c with an intervening intron of 11.82 kb, which displays splice signals consistent with the GT/AG rule. Exons 0b and 0c are 42 nt- and 156 nt-long, respectively; exon 0c is then spliced to the common exon 1b.

Transcript variant 8 found in the prostatic cell line PC3, contains a novel first exon, called exon 0d, spliced to another new exon 1e after an intron of 4.8 kb. Exon 0d is 17 nt-long, whereas 1e contains 73 nt. Exons 0d is downstream and very close to exon 1b, being separated by only 875 nt. Exon 1e is spliced to exon 2 after an intron of 56.4 kb. Exon 0d and exon 1d are partially coding.

Due to the presence of different putative ATGs in exons 0d, 1a, 1b, and 2, the N-terminal region of the encoded proteins may be different, with the longest protein translated from exon 0d. These differences in the N-terminal region should not affect the catalytic activity of STS, because they bear upon the signal peptide in all proteins.

Sequence analysis revealed that neither the TATA box nor the initiator element were present upstream of the 8 first exons of the human STS gene.

To obtain a fast and overall picture of the STS transcriptional patterns in different tissues with at least quantitative indications of the most expressed STS variants, I set up a multiplex ligation-dependent amplification procedure (RT-MLPA). MLPA and RT-MLPA are relatively new techniques that permit the simultaneous PCR amplification and quantification of different sequences.

I chose this analysis instead of real time PCR as it is less time-consuming, less expensive, requires low quantities of RNA (down to 10 ng of total RNA) and with only one reaction it is possible to investigate all the STS transcription patterns up to now identified.

I showed that exon 1a is expressed at very high levels in placenta. Nevertheless, this transcript has been found also in normal and cancerous lung, thus confirming the results obtained by 5'-RACE analysis. Low levels of expression were found also in other tissues.

Exon 1c, previously found in thyroid, peripheral MNL and ovarian cancer, is expressed in all tissues analysed, except the arthrosic cartilage of the femoral head, but always at very low levels. Exon 1d and particularly exon 1e were expressed in a restricted number of tissues and at low expression levels.

Exon 1b was instead expressed in all samples analysed with levels ranging from 9 to 52% of exon 1b placental expression and from 4.6 to 26% of exon 1a placental expression.

Although exons 0a, 0b and 0c are always linked to exon 1b, I analysed also their specific patterns of expression, as they are presumably driven by different promoters. The highest levels of expression were found for exon 0b and the lowest for exon 0c.

DISCUSSION: In recent years, STS has emerged as a key player in the maintenance of high intratumoral estrogen and androgen levels through intracrine biosynthesis from sulfated precursors, and, hence, in the growth stimulation of steroid hormone-dependent tumors.

ABSTRACT

The studies on the transcriptional control of STS have demonstrated the possibility of a tissue-specific regulation, as previously found for other steroidogenic enzymes, such as aromatase.

In particular, during these 3 years, I have characterized eight different transcriptional patterns, indicating that the expression of this enzyme is tightly regulated, in line with its importance in cellular functions.

To understand the role of STS variants and in order to explore their expression patterns, I performed a 5'-RLM-RACE on RNA from different normal and cancer tissues.

To confirm 5'RACE data, I have set up an RT-MLPA protocol that allows the qualitative and semi-quantitative analyses of all the known STS transcripts.

In conclusion, the present study suggests that the STS gene exhibits alternative splicing and promoter usage, which are likely to be the basis for tissues-specific regulation.

OBIETTIVO

L'enzima steroide solfatasi (STS) promuove la reazione di idrolisi degli ormoni steroidei coniugati al solfato come il deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) e l'estrone solfato (E1-S) permettendo la formazione di composti ormonalmente attivi.

Questa attività riveste un ruolo fondamentale nell'uomo visti gli elevati livelli plasmatici del DHEA-S, e inoltre lo studio di tale enzima, negli ultimi anni, è stato notevolmente potenziato a causa delle possibili implicazioni che l'attività di questo potrebbe avere nello sviluppo dei tumori ormono-dipendenti come quelli della mammella, dell'utero, dell'ovario e della prostata.

Infatti, gli alti livelli di espressione del messaggero codificante l'enzima STS sono stati associati ad una cattiva prognosi per il tumore alla mammella in donne in pre- e post menopausa.

Pertanto, vista l'importanza dell'enzima steroide solfatasi, e le poche informazioni sperimentali sulla regolazione del gene, ho ritenuto interessante lo studio delle modalità di trascrizione di questo enzima a livello non solo della placenta ma anche degli altri tessuti e organi in cui viene espresso.

Mediante analisi RML-RACE, ho analizzato la regione 5'-terminale dei messaggeri codificanti l'enzima STS, evidenziando come la regolazione dell'espressione di questo enzima si attui mediante l'utilizzo di almeno otto primi esoni alternativi associati a promotori prossimali diversi. Inoltre tutti i promotori prossimali individuati sono privi di TATA box e quindi presentano siti di inizio della trascrizione variabili.

Vista l'importanza della regolazione tessuto-specifica di questo gene, si è valutata la possibilità di analizzare, in tessuti diversi, le differenti varianti trascrizionali, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

Ricercando un modo rapido ed economico per condurre queste analisi ho scelto di mettere a punto ed applicare una nuova metodica, la MLPA ovvero *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*. Questa metodica si propone come una possibile alternativa alla Real Time PCR nel caso di analisi di espressione genica.

INTRODUZIONE

1. Una visione d'insieme

In questi ultimi anni, le analisi e le sperimentazioni endocrinologiche sono state caratterizzate da un notevole sviluppo di tecnologie oltre che da un evidente aumento in termini di pubblicazioni (Garabed, 2004). Ciò grazie ai progressi in diversi campi quali la chimica, la fisica, la biologia cellulare e molecolare, la genetica, l'immunologia e le neuroscienze (Dillo *et al.*, 2006), che hanno consentito lo studio in campo umano di patologie e disfunzioni metaboliche dovute ad alterazioni della sintesi, secrezione, trasporto ed azione degli ormoni.

Un settore di ricerca di notevole rilevanza riguarda i tumori ormono-dipendenti, ed un particolare interesse è stato rivolto negli ultimi anni ad un enzima appartenente al gruppo proteico delle arilsolfatasi, e cioè la steroide solfatasi o STS. La sua attività catalitica consiste, infatti, nell'idrolizzare steroidi coniugati con gruppi solfato, liberando la componente steroidea convertibile in composti biologicamente attivi. Questi, nei tumori ormono-dipendenti, possono determinare una progressione della crescita neoplastica. In tumori mammari, ad esempio, si è osservato un aumento dell'attività di questo enzima, mentre la mancanza di attività dell'STS è alla base dell'ittiosi, una patologia legata al sesso (*X-linked*) con pronunciati disturbi a livello cutaneo.

2. La reazione di solfatazione e l'enzima STS nella steroidogenesi

La steroide solfatasi agisce in una via metabolica di biosintesi ormonale, la steroidogenesi, con il ruolo di produrre, mediante l'idrolisi degli esteri-solfato degli steroidi coniugati, intermedi dai quali ottenere infine ormoni steroidei biologicamente attivi. Il sentiero metabolico in cui questo enzima è coinvolto è caratterizzato da un meccanismo reversibile di notevole importanza per l'organismo, vale a dire quello della solfatazione. Tale reazione risulta giocare un ruolo chiave nel metabolismo degli xenobiotici, nella biosintesi degli steroidi, nella modulazione dell'attività biologica e nell'inattivazione ed eliminazione di

potenti composti chimici endogeni, tra cui ormoni tiroidei, steroidi e catecolamine.

Il *pathway* metabolico di attivazione/inattivazione è caratterizzato principalmente dall'azione di due famiglie enzimatiche: le solfotransferasi (SULT) catalizzanti la reazione di solfatazione, e le solfatasi/arilsolfatasi (ARS), che catalizzano la reazione inversa, ossia l'idrolisi degli esteri solfato o desolfatazione.

Per quanto riguarda l'azione svolta dalla STS nella biosintesi degli steroidi, va ricordato che nel circolo sanguigno dell'uomo e dei primati sono presenti in concentrazioni elevate ormoni steroidei coniugati al solfato, come il deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) precursore, a livello periferico, di androgeni ed estrogeni attivi, e l'estrone solfato (E1-S), che rappresenta invece l'estrogeno più abbondante in circolo. Il ruolo degli steroidi solfato è particolarmente rilevabile durante la gravidanza che, nell'essere umano e nei primati, viene caratterizzata da un livello estremamente elevato nella produzione di estrogeni, i quali esercitano un ruolo essenziale nel mantenimento e nel completamento della gravidanza stessa. Gli estrogeni vengono sintetizzati grazie alla produzione di DHEA-S a livello della surrenale fetale. Questo steroide viene poi utilizzato nella placenta come substrato per la formazione di estrogeni in seguito all'idrolisi del gruppo solfato ad opera dell'enzima STS e alla reazione di aromatizzazione. Nell'adulto, il DHEA-S viene prodotto in elevate concentrazioni (dell'ordine micromolare) dalla surrenale e poi captato a livello dei tessuti periferici per essere utilizzato nei processi di 5α -riduzione o di aromatizzazione (steroidogenesi periferica di tipo intracrina). La solfatazione di tutte le classi di steroidi avviene anche in molti altri tessuti, sia nel feto che nell'organismo adulto, quali fegato, intestino, cervello e rene. (Parker *et al.*, 1994; Miki *et al.*, 2002).

L'E1-S, precursore del 17β -estradiolo (E2), viene idrolizzato dalla STS (da qui deriva l'altro sinonimo dell'enzima, estrogene solfatasi o ES) a E1 nei tessuti bersaglio degli estrogeni quali la ghiandola mammaria o l'utero, e successivamente convertito in E2.

La STS gioca quindi un ruolo centrale nel mantenimento di alti livelli di estrogeni nel cancro alla mammella, favorendo così la loro azione nello sviluppo del tumore (Howarth *et al.*, 1994). Non solo, l'attività della steroide solfatasi risulta essere importante anche a livello epidermico dove idrolizzando il colesterolo solfato

(CHO-S), lo rende attivo per la differenziazione dei cheratinociti. Infatti, l'assenza della STS comporta l'accumulo di CHO-S nello strato corneo con conseguenti anomalie dello sviluppo cutaneo come l'ipercheratosi (Coughtrie *et al.*, 1998).

3. Arilsolfatasi

La ricerca svoltasi in questi ultimi anni ha dimostrato che l'enzima STS fa parte di una complessa famiglia di enzimi solfatasici che condividono similarità di sequenza amminoacidica e di cui, fino ad ora, sono identificati nell'uomo 17 componenti.

Di questi, 13 sono stati clonati e caratterizzati, più o meno completamente. La loro azione consiste nel catalizzare l'idrolisi dei legami estero-solfato di una vasta serie di molecole, come per esempio, steroidi, carboidrati, proteoglicani e glicolipidi. Di tale gruppo proteico fanno parte le arilsolfatasi, le quali possiedono un ruolo molto importante in diversi processi fisiologici, come le regolazioni ormonali, la degradazione cellulare e la modulazione dei sentieri di trasduzione dei segnali.

L'importanza delle arilsolfatasi viene resa evidente dalla manifestazione di malattie genetiche dovute alla mancanza della loro attività. Tali enzimi sono infatti stati caratterizzati a causa della loro associazione con disfunzioni la cui insorgenza è determinata dall'assenza della loro azione.

Esiste, per esempio, una rara patologia autosomica recessiva, la Deficienza Multipla delle Solfatasi o MSD, nella quale viene a mancare l'azione di tutte le solfatasi conosciute. La causa eziologica sembrerebbe essere una fortissima riduzione del meccanismo di modificazione post-traduzionale che consiste nella conversione di un residuo conservato di cisteina del sito attivo dell'enzima in C α -formilglicina, impedendo in tal modo l'attivazione dell'enzima stesso (Sardiello *et al.*, 2005).

Da studi recenti si è arrivati ad identificare e descrivere (per alcune non ancora completamente) 11 arilsolfatasi, ottenendo informazioni molto utili dal punto di vista clinico-farmacologico.

A tal proposito, qui di seguito, viene elencata la lista delle arilsolfatasi umane, fino ad ora conosciute, con una breve descrizione circa la loro localizzazione subcellulare, attività e malattie ad esse correlate:

- **ARSA:** enzima lisosomiale, responsabile della degradazione dei solfatidi e la cui assenza determina l'accumulo di tali molecole all'interno dei lisosomi degli oligodendrociti e delle cellule di Schwann nei sistemi nervosi centrale e periferico; questo determina la degenerazione della mielina, tipico sintomo della leucodistrofia metacromatica (MLD).
- **ARSB:** enzima lisosomiale, agisce idrolizzando glicolipidi solfato e complessi carboidrati; la sua assenza è associata alla sindrome di Maroteaux-Lamy (MPS), una malattia autosomica recessiva caratterizzata dall'accumulo di solfati nei lisosomi. Le osservazioni cliniche includono anche una crescita anormale dell'organismo accompagnata da piccola statura, malformazioni scheletriche, opacità corneali, epatosplenomegalia e anomalie cardiache.
- **ARSC/STS:** enzima principalmente localizzato nel reticolo endoplasmatico, catalizza l'idrolisi dei legami estere-solfato di steroidi solfato. La mancanza di attività della STS comporta una malattia denominata ittiosi, come più sopra accennato.
- **ARSD:** localizzata nel reticolo endoplasmatico e potenzialmente nei lisosomi; mostra un'espressione tessuto-specifica per pancreas, rene, fegato, polmone, placenta, cervello e cuore. L'attività e quindi il substrato restano ancora sconosciuti.
- **ARSE:** localizzata nell'apparato di Golgi, il suo ruolo non è ancora stato ben definito nonostante si sia a conoscenza di una malattia congenita dovuta a difetti nella sua attività. Tale patologia è la condrodiplosia puntata 1 o CDPX1, una malattia caratterizzata da anormale sviluppo di cartilagine e ossa e che può essere indotta tramite inibizione di ARSE dopo somministrazione di warfarina, un anticoagulante cumarinico.
- **ARSF e ARSG:** localizzate nel reticolo endoplasmatico. L'attività e quindi il substrato restano ancora sconosciuti.
- **ARSH, ARSI, ARSJ e ARSK:** localizzazione subcellulare diffusa, in parte lisosomiale, caratterizzazione ancora incompleta.

Durante questi tre anni di dottorato mi sono occupata dello studio di una delle 11 arilsolfatasi appena elencate: la ARSC, anche denominata STS, ossia steroide solfatasi. In particolare questo enzima idrolizza il gruppo solfato che si trova in

posizione 3 o 3 β , portando alla formazione di steroidi non coniugati ed in alcuni casi già biologicamente attivi.

Lo studio di tale enzima, in questi ultimi anni, è stato spinto dalla sua associazione sia con l'ittiosi X-linked, (Ballabio e Shapiro, 1995), malattia dovuta all'assenza della sua attività, che dall'associazione con lo sviluppo di tumori ormono-dipendenti, come quelli alla mammella, per i quali i livelli della proteina STS possono essere utilizzati come marcatore prognostico.

In particolare, la sindrome dell'ittiosi è stata riconosciuta come malattia genetica per mutazioni del gene codificante ARSC con localizzazione prossimale all'area pseudoautosomica (PAR) del braccio corto del cromosoma sessuale X e precisamente nella regione Xp22.3-Xpter. Recentemente è stato scoperto che tale porzione cromosomica presenta, ad una distanza di 4 Mb dal gene codificante l'STS, un *cluster* di geni codificanti anch'essi arilsolfatasi e precisamente ARSD, ARSE, ARSF e ARSH, di cui si è accennato precedentemente (Sardiello *et al.*, 2005).

Il dato rilevante di tale scoperta è che le suddette quattro arilsolfatasi mostrano un'organizzazione genomica comune e un'alta omologia di sequenza con ARSC, il che suggerirebbe la loro origine da duplicazioni geniche a partire da un unico gene ancestrale.

Inoltre, dalle analisi delle sequenze dei geni omologhi localizzati sul cromosoma Y e da tutto l'insieme dei dati raccolti circa l'evoluzione di tali geni, si pensa che gli eventi di duplicazione, che hanno portato alla generazione del cluster, siano avvenuti prima che le copie geniche X- e Y-linked abbiano iniziato a divergere (Reed *et al.*, 2005).

4. Biologia molecolare del gene della steroide solfatasi

Il gene dell'STS è pseudautosomico, sfugge all'inattivazione del cromosoma X e possiede uno pseudogene omologo Y-linked non trascrizionalmente attivo a causa della delezione del promotore e/o di alcuni esoni, oltre che dalla presenza di numerosi codoni di stop e di larghe inserzioni nucleotidiche. Le due copie geniche presentano un'estesa similarità di sequenza facendo presupporre che la loro divergenza sia avvenuta circa 40 milioni di anni fa (Yen *et al.*, 1988).

Il *locus* per il gene umano dell'STS X-linked è stato clonato, caratterizzato e sequenziato da librerie di cDNA di placenta umana (GeneBank *accession number* M23945; Essembl *accession number* ENSG00000101846). La struttura del gene determinata a partire da tale sequenza presenta 10 esoni intervallati da introni di diversa lunghezza, da 102 pb a 35 kb, per un totale di 146 kb.

In aggiunta, esperimenti di Northern blotting hanno messo in evidenza trascritti di lunghezza diversa determinati, secondo gli autori, dall'uso di siti di poliadenilazione alternativi all'interno del decimo esone (Ferrante *et al.*, 2002).

La regione promotrice risulta essere inusuale in quanto manca del TATA box, non possiede isole ricche in GC e risulta difettiva anche di regioni di ancoraggio per il fattore Sp1 e per altri fattori di trascrizione noti. Non possiede cioè strutture o elementi associati a molti promotori eucariotici (Li *et al.*, 1996).

Possiede, come spesso succede per geni privi di TATA box, più siti di inizio della trascrizione, il maggiore dei quali è stato mappato, rispetto al codone di inizio della traduzione, a -221 pb. Altri tre siti, presenti con frequenza minore, mappano a -197, -206, e -241, e ciò porta ad avere quattro siti di inizio della trascrizione dispersi in una regione di circa 50 bp.

Nella regione promotrice sono stati identificati quattro elementi di regolazione (URE), tre dei quali agiscono come enhancers e si trovano così dislocati :URE1 da -305 a -572, URE2 da -870 a -1086, e URE3 da -1087 a -1253. Le tre regioni sono controbilanciate dalla presenza di una regione regolatrice negativa (URE4) localizzata da -1253 a -1458.

La transfezione del promotore basale e dei fattori UREs in linee cellulari come COS-1, HeLa, e B82 non produce alcuna attività trascrizionale e ciò fa supporre che nella placenta, in cui è attivo tale promotore, vengano prodotti fattori tessuto specifici necessari per stimolare la trascrizione del gene STS (Reed *et al.*, 2005 e Li *et al.*, 1996).

Analisi dell'espressione del gene STS nel tessuto adiposo sottocutaneo umano condotte nel nostro laboratorio precedentemente alla mia tesi (Dalla Valle *et al.*, 2006) avevano messo in evidenza come questo enzima fosse regolato in modo tessuto specifico e pertanto, spinti dal fatto di aver trovato due trascritti alternativi a quello già riportato in letteratura (Li *et al.*, 1996), che differivano rispetto a

questo nella regione 5'-non tradotta abbiamo deciso di approfondire questo dato espandendo la nostra ricerca a diversi tessuti umani.

5. Struttura e meccanismo d'azione della STS

Il clonaggio e il sequenziamento del cDNA della STS placentare hanno portato ad acquisire informazioni circa alcune caratteristiche del trascritto. Questo risulta essere tradotto in un precursore (EC 3.1.6.2) di 583 amminoacidi con peso molecolare pari a 63 kDa, dotato di un peptide segnale di 23 amminoacidi. Dopo la traduzione, il precursore viene sottoposto a clivaggio producendo una proteina matura costituita da 560 amminoacidi, con quattro potenziali siti di N-glicosilazione, due dei quali vengono usati (residui di asparagina 47 e 259; mentre 333 e 459 non risultano glicosilati).

La struttura terziaria della proteina (Fig. 1) consiste in due domini: un dominio globulare (55x60x70 Å) di natura polare, che comprende il sito catalitico e che si trova nel lume del RE ed un dominio transmembrana, costituito da due catene ad α -elica idrofobiche e disposte in modo antiparallelo (Fig. 1) (Hernandez-Guzman *et al.*, 2003):

- **Dominio globulare:** è costituito da due sottodomini SD1 e SD2 formati da strutture secondarie ad α -elica e a foglietto β disposte l'una sull'altra a formare un sandwich (Fig. 1). SD1, che contiene il sito catalitico, comprende 11 foglietti β racchiusi da 13 α -eliche; mentre SD2 consiste approssimativamente di 110 residui C-terminali e di 4 foglietti β antiparalleli. Lo steroide si lega covalentemente all'amminoacido idrossiformilglicina (FG) attraverso il gruppo solfato. FG⁷⁵ deriva da una modificazione post-traduzionale, necessaria per l'attivazione dell'enzima, della Cys⁷⁵ nel sito catalitico. Questo ultimo è anche costituito dai residui Asp³⁵, Asp³⁶, Asp³⁴², Gln³⁴³ ai quali, oltre che a FG⁷⁵, si lega uno ione Ca²⁺ (Fig. 2). Sono inoltre presenti amminoacidi che instaurano legami di tipo idrofobico con lo steroide permettendo il riconoscimento ed un maggior ancoraggio del substrato.

• **Dominio transmembrana:** è formato da due catene ad α -elica, di una lunghezza di circa 40 Å che attraversano il doppio strato fosfolipidico della membrana del RE. Questa porzione permette l'ancoraggio del dominio funzionale alla membrana ed inoltre forma un tunnel attraverso il quale passa lo steroide solfato che deve raggiungere il sito catalitico in SD1.

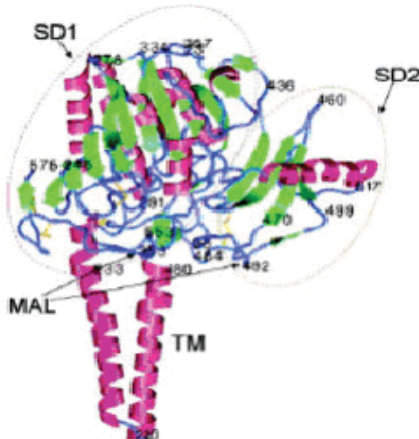


Fig. 1. Struttura secondaria e terziaria della STS. Sono mostrati i due sottodomini SD1 e SD2, il dominio transmembrana TM e le due regioni del dominio globulare che interagiscono con la membrana (MAL) (Hernandez-Guzman *et al.*, 2003).

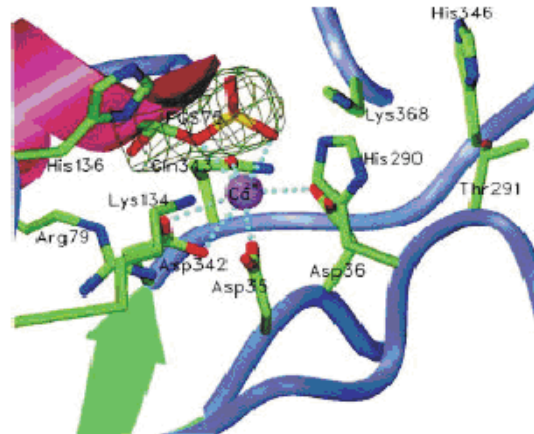


Fig. 2. Sito catalitico della STS. E' visibile l'atomo di calcio che interagisce con gli amminoacidi Asp35, Asp36, ASP342, Gln343 e FG75 (Hernandez-Guzman *et al.*, 2003).

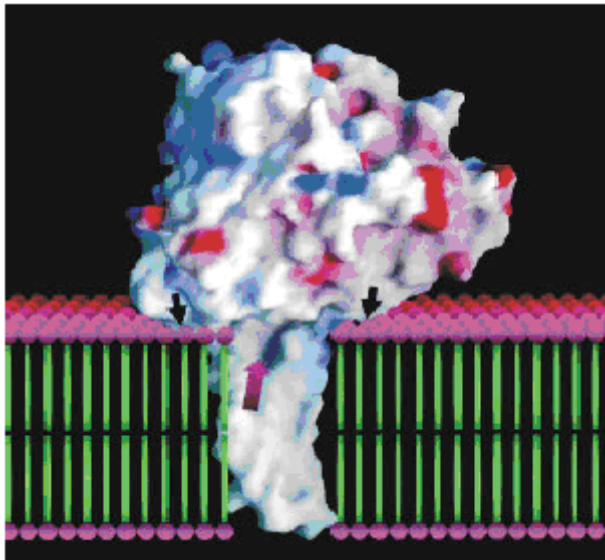


Fig. 3. Struttura terziaria della STS che mette in evidenza il modo in cui l'enzima è ancorato al doppio strato fosfolipidico della membrana. La freccia rosa indica il percorso del DHEA attraverso il tunnel formato dalle due catene

• **Meccanismo d'azione (Fig. 4):**

L'azione catalitica della steroide solfatasi consiste nella desolfatazione degli steroidi che presentano un gruppo solfato in posizione 3 o 3 β . Come per le altre

solfatasi, alla catalisi partecipano specifici residui carichi positivamente e cioè Arg⁷⁹, Lys¹³⁴, Hys¹³⁶, Hys²⁹⁰, Lys³⁶⁸ oltre ad altri residui neutri sempre del sito attivo. Il meccanismo d'azione può essere suddiviso in tre *step* così di seguito indicati:

- 1) Attivazione della FG⁷⁵ in idrossilformilglicina HFG⁷⁵ per aggiunta di una molecola d'acqua.
- 2) Lo steroide solfato si lega alla HFG⁷⁵ distaccandosi dal solfato. Si libera quindi il substrato non coniugato.
- 3) Viene ripristinato il residuo FG liberando HSO₄⁻. A questo punto l'enzima è nuovamente attivo ed FG può legarsi ad un'altra molecola di substrato.

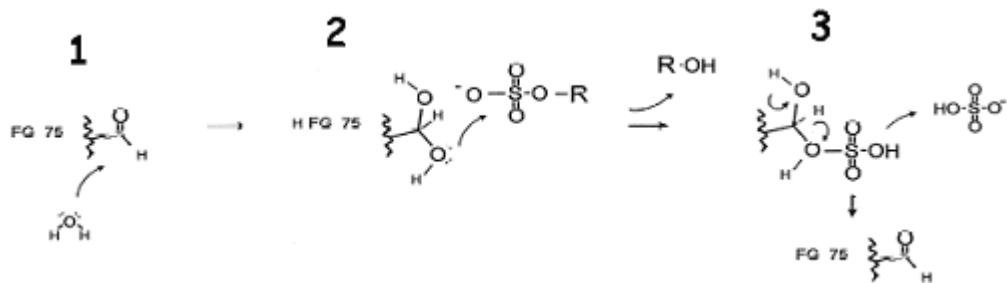


Fig. 4. Schematizzazione in tre step del meccanismo d'azione dell'enzima steroide solfatasi (Hernandez-Guzman, 2003 modificato).

Analisi molto recenti sulla struttura/funzione della STS conducono a considerare importanti per la sua attività entrambe le regioni terminali. Esperimenti di mutagenesi hanno permesso di analizzare i livelli di attività di proteine differentemente delete rispetto a quella wild type (si fa riferimento al precursore di 583 amminoacidi).

Ciò che sommariamente risulta è che il mutante Δ C2 (1-559: delezione degli ultimi 24 amminoacidi) presenta una attività molto ridotta; Δ N1 (24-583: delezione dei primi 24 amminoacidi) e Δ N1C2 (24-559) non mostrano alterazioni sulla traduzione; Δ N2 (52-583: delezione dei primi 52 amminoacidi includendo il sito di N glicosilazione 47) e Δ N2C2 (52-559) subiscono una rapida degradazione a causa dell'inadeguato folding proteico (Sugawara *et al.* 2006).

Se da una parte la regione N-terminale appare coinvolta non solo nella traslocazione della proteina in quanto contenente il peptide segnale, ma anche nel garantire stabilità alla proteina con il giusto folding grazie al processo di

glicosilazione, dall'altra la regione C-terminale è quella che più direttamente permette l'attività proteica in quanto contiene residui prossimali al sito catalitico.

• **Organizzazione oligomerica:**

I dati reperibili in letteratura rimangono ancora ambigui circa la possibile oligomerizzazione della steroido solfatasi individuando possibili stati da monomero ad esamero. D'altra parte, analisi di cristallografia per diffrazione ai raggi X condotte da Hernandez-Guzman nel 2001 porterebbero a concludere che gli stati più plausibili siano di monomero o di omodimero sottolineando che l'ambiguità conformazionale potrebbe derivare da variazioni nell'aggregazione in associazione con le diverse condizioni come quelle del tampone, pH, detergenti e forza ionica comportando in tal modo la formazione di organizzazioni non specifiche rispetto a quella funzionale (Hernandez-Guzman *et al.*, 2001). Resta quindi da indagare ulteriormente al fine di dare una risposta chiarificatrice circa le adatte condizioni da utilizzare per ottenere una struttura enzimatica corretta.

6. Il gene dell'STS sfugge all'inattivazione del cromosoma X

Per quanto riguarda l'essere umano, è stato dimostrato che il gene della STS sfugge all'inattivazione del cromosoma X (Shapiro *et al.*, 1979). Gli studi condotti circa tale proprietà dimostrano come il dosaggio tra femmine e maschi normali risulta 1,4-1,8 volte più attivo nelle cellule e tessuti di origine femminile rispetto a quelli maschili, valore, quindi, inferiore a quello del rapporto atteso di 2:1. (Bedin *et al.*, 1981; Epstein e Leventhal, 1981). Di conseguenza, questi dati portano a desumere una minore espressione dell'allele STS associato al cromosoma X inattivo rispetto alla copia presente su quello attivo, indicando perciò un'inattivazione di tipo parziale (Migeon *et al.*, 1982).

Recentemente sono stati condotti studi circa l'attività dell'enzima steroido solfatasi in colture di trofoblasti riportando un aumento dei livelli da 1,7 a 3,2 solo in cellule XX e non in quelle XY nelle quali l'attività dell'enzima rimane costante. Questo porta ad ipotizzare una stimolazione sesso specifica di induzione/inibizione influenzata presumibilmente dall'intervento di fattori del

medium di coltura come gli steroidi i cui recettori sono differentemente espressi nelle cellule (Ugele *et al.*, 2000). Inoltre, l'“instabilità” di inattivazione che ne consegue potrebbe essere correlata al fatto che queste cellule presentano un lieve stato di metilazione dei cromosomi X inattivi.

7. Localizzazione dell'enzima STS

Come già stato riportato, la proteina steroide solfatasi è considerata una tra i principali enzimi che contribuiscono alla consistente produzione di estrogeni nei tessuti tumorali ormono-dipendenti, per esempio quelli della mammella. Per questo motivo viene considerato come un target terapeutico, tramite lo sviluppo di inibitori contro l'attività dell'STS stesso. A tale proposito, però, emerge la necessità di caratterizzarlo accuratamente ponendo l'attenzione sulla sua localizzazione a livello cellulare oltre che tissutale attraverso metodiche come l'immunoistochimica, l'ibridazione in situ dell'mRNA e, più recentemente, la RT-PCR.

L'insieme dei dati raccolti dalle analisi condotte in questi ultimi anni, porta a descrivere la steroide solfatasi come una proteina localizzata prevalentemente nel reticolo endoplasmatico rugoso e liscio e secondariamente nelle cisterne perinucleari dell'apparato di Golgi, nel reticolo del trans-Golgi, nelle membrane plasmatiche e nei componenti compresi nel pathway endocitico senza individuare, a differenza della maggior parte delle arilsolfatasi, alcuna espressione a livello lisosomiale.

Dopo la caratterizzazione a livello cellulare, analisi a livello tissutale hanno evidenziato come la localizzazione di questo enzima sia di tipo pressoché ubiquitario con alcune differenze tra i diversi mammiferi. In un organismo normale umano adulto la fonte più ricca di tale enzima risulta essere la placenta, mentre livelli più bassi (da meno dell'1% al 3.7% rispetto ai livelli di espressione placentari) sono stati individuati in mammella, ovario, endometrio, testicoli, prostata, epidermide, ossa, linfociti periferici, aorta, cervello, ghiandola surrenalica, polmone, rene e fegato. Non solo, ma il corrispondente trascritto è stato determinato anche in numerosi tessuti fetali sebbene, anche in questo caso, i livelli siano più bassi (1-2.9 %) (Reed *et al.*, 2005).

8. Ruolo biologico della STS

La steroido solfatasi, come già descritto, è un enzima di membrana coinvolto nel pathway metabolico costituente la produzione degli ormoni steroidei e che si attua principalmente a livello di cellule endocrine delle surrenali, delle ovaie, dei testicoli e della placenta. I substrati di tale enzima sono alcuni steroidi solfato come il pregnenolone-S (PRE-S), il colesterolo-S (CHO-S), il deidroepandrosterone-S (DHEA-S) e l'estrone-S (E1-S) per i quali l'azione della STS è necessaria al fine di ottenere composti biologicamente attivi (Choe *et al.*, 1982).

Esistono recenti evidenze secondo le quali la STS indurrebbe un aumento dell'attività della proteina mitocondriale StAR umana (Steroidogenic Acute Regulatory protein), proteina implicata nel trasporto all'interno del mitocondrio del CHO desulforilato dalla steroido solfatasi; questo grazie ad un incremento della traduzione e dell'emivita di StAR. Il meccanismo con cui la steroido solfatasi eserciterebbe direttamente o indirettamente tale effetto stimolatorio rimane ancora sconosciuto (Sugawara *et al.*, 2004).

Del resto, gli studi condotti in questi anni permettono di caratterizzare il ruolo biologico della steroido solfatasi a livello di diversi organi e tessuti del corpo umano evidenziando l'importanza della sua attività dal punto di vista fisiologico-patologico.

Qui di seguito verranno descritti i ruoli della proteina nei diversi siti somatici che fino ad ora sono stati meglio esaminati.

- **Nei trofoblasti.** Tecniche di immunistoichimica hanno rilevato l'enzima STS a livello del reticolo endoplasmatico di trofoblasti sinciziali mostrando massimi livelli alla fine del primo e all'inizio del secondo trimestre di gestazione (Salido *et al.*, 1990).

Il tessuto in cui è maggiormente espressa la STS risulta essere proprio la placenta a livello della quale l'enzima desulforila i precursori degli estrogeni, vale a dire il DHEA-S ed il 16-OH-DHEA-S convertiti rispettivamente ad E1 (e quindi ad E2) e ad estriolo, E3, composti questi indispensabili per il mantenimento dello stato gravidico uterino e la crescita del feto. Durante una gravidanza, infatti, la sintesi placentare degli estrogeni aumenta considerevolmente, in particolare nella fase

dei follicoli ovarici, nelle cellule della granulosa, nello stroma, nel corpo luteo e nelle tube di Falloppio dove avviene il processamento di DHEA-S con produzione di DHEA non coniugato, androstenedione e testosterone. *Nell'uomo*: l'STS risulta presente nei testicoli e prevalentemente nella prostata contribuendo alla produzione di androgeni biologicamente attivi, come testosterone e 5α -diidrotestosterone (5α -DHT). In particolare, nei testicoli, l'enzima sarebbe coinvolto nei processi di maturazione e capacitazione degli spermatozoi (Reed *et al.*, 2005).

- **A livello epidermico.** Nell'epidermide, l'enzima gioca un ruolo molto importante nel contribuire alla produzione di androgeni. Mutazioni invalidanti l'espressione del gene corrispondente comportano il manifestarsi dell'ittiosi, patologia caratterizzata da desquamazione della pelle con grandi scaglie di colore bruno e un incremento dello spessore dello strato corneo. Tali anomalie cutanee sembrano derivare da un innalzamento della concentrazione di CHO-S nello strato corneo e alla incapacità dell'epidermide di formare CHO libero, importante per la sua funzione strutturale a livello dei lipidi di membrana (Williams e Elias, 1981). Tecniche di immunistochemica hanno individuato l'STS prevalentemente a livello della papilla dermica del pelo dove la sua attività appare essere implicata nello sviluppo dell'alopecia androgenica (Hoffmann *et al.*, 2001). Questo perché l'azione di desolfatazione del DHEA-S rende disponibile DHEA libero con successiva conversione in 5α -DHT, steroide che possiede un ruolo cruciale sia nella regolazione della crescita dei capelli che nel processo della calvizie. La produzione locale di 5α -DHT, infatti, dipende dalla concentrazione dei precursori steroidei, tra i quali, sebbene il testosterone risulti quello principale, il DHEA-S viene utilizzato in una via metabolica che appare importante nella perdita dei capelli (Reed *et al.*, 2005).

- **Negli osteoblasti.** Il legame fra menopausa ed osteoporosi è noto da tempo: la cessata produzione di estrogeni gonadici rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza della malattia. Gli estrogeni, infatti, intervengono nella regolazione della quantità di calcio presente nell'osso: venendo meno il loro controllo, il calcio si riduce, lasciando una struttura porosa e fragile. Non esistono, però, evidenze di differenze nel livello plasmatico degli estrogeni tra donne della stessa età con osteoporosi e non affette. Si è quindi ipotizzata la possibilità di una sintesi

endogena degli estrogeni a livello degli osteoblasti dal momento che è stata riscontrata, in tre linee cellulari umane HOS, MG63 e U2OS, un'attività dell'STS cento volte maggiore di quella dell'aromatasi. Questo suggerisce che la formazione locale di E1 a partire da E1S sia molto importante per la regolazione della osteogenesi. A sostegno di ciò, è possibile rilevare un aumento della perdita di tessuto osseo per indotta inibizione dell'attività enzimatica (Reed *et al.*, 2005).

• **Nel sistema immunitario.** L'implicazione dell'STS nel sistema immunitario è riferita alla catalisi, da esso esercitata, della conversione di DHEA-S in DHEA, il solo tra i due, che sembra partecipare alla regolazione della maturazione delle cellule T-helper (Th). I linfociti Th possono avere fenotipo Th1 o Th2 in base al quale producono un profilo caratteristico di citochine (Th1: IL-2, interferone γ , etc.; Th2: IL-6, IL-10, etc.). Queste mostrano un'azione inibitoria incrociata della determinazione dell'uno o dell'altro fenotipo: l'interferone γ contrasta la formazione di Th2, mentre IL-10 quella di Th1. In aggiunta, è stato rilevato *in vitro* che sempre solo il DHEA, e non la forma coniugata, sia in grado di contrastare il rilascio delle citochine da parte delle cellule Th2. Da tali evidenze, quindi, è possibile che l'STS, presente nei macrofagi del tessuto linfoide dove maturano i linfociti e nei linfociti stessi, possieda un ruolo cardine all'interno della risposta immunitaria.

Non solo, ma da ulteriori investigazioni è emerso che il bilancio tra DHEA e i glucocorticoidi influisce sul progresso delle cellule Th con la determinazione del fenotipo 1 in presenza di DHEA e del fenotipo 2 in presenza di cortisolo.

Queste conoscenze risultano particolarmente utili in quanto l'inibizione dell'STS e la conseguente mancata stimolazione delle cellule Th verso la forma Th1, potrebbero avere effetti terapeutici verso condizioni patologiche (come l'artrite reumatoide) dovute ad una inappropriata risposta immunitaria e ad un incremento della produzione di citochine da parte dei linfociti Th1 (Reed *et al.*, 2005).

• **Nei leucociti e trombociti.** L'STS risulta essere espresso in leucociti del sangue periferico e nei trombociti manifestando livelli di attività enzimatica maggiori in soggetti di sesso femminile rispetto a quelli maschili. Tale evidenza, associata alla massiccia presenza di infiltrati linfocitari all'interno del tumore ormono-dipendente della mammella, farebbe pensare che queste cellule diano un contributo importante alla sintesi di estrogeni nel tessuto neoplastico, suggerendo

quindi la possibilità di individuare ulteriori strategie terapeutiche contrastanti l'eccessiva steroidogenesi promossa dalla steroido solfatasi e promuovente la tumorigenesi (Reed *et al.*, 2005).

- **A livello neuronale.** Studi condotti su roditori conducono a postulare il coinvolgimento di DHEA e DHEA-S, come neurosteroidi, nel potenziamento delle capacità mnemoniche a livello di strutture del sistema nervoso centrale. Dal momento che nei tessuti neuronali è stata rilevata attività della STS, è ammissibile pensare che la formazione di DHEA, a partire dalla forma coniugata, avvenga ad opera di tale enzima solfatasi.

Infatti, l'inibizione della conversione provoca fenomeni di amnesia nell'individuo trattato, sostenendo quindi l'ipotesi suddetta. D'altra parte non esistono ancora dati dimostrativi circa la potenzialità di questi neurosteroidi e soprattutto non ne esistono riferiti all'essere umano considerando il fatto che non tutti i soggetti affetti da deficienza dell'attività della STS mostrano carenze cognitive (Reed *et al.*, 2005).

9. Regolazione dell'attività della STS

Analogamente a tutti gli altri enzimi coinvolti nella steroidogenesi, anche la steroido solfatasi risulta finemente controllata da elementi regolatori positivi e negativi della sua espressione e attività come, citochine, fattori di crescita e steroidi.

IL-6 e TNF α promuovono l'attività di STS senza operare a livello del promotore e di *enhancer* suggerendo quindi che il controllo avvenga mediante modificazione post-traduzionale della Cys nel sito attivo in FG, o indirettamente attraverso cambiamenti della fluidità di membrana o tramite un aumentato *uptake* di substrati solfati. È da notare il circuito di retroazione che si stabilisce tra il DHEA prodotto da STS che deprime la secrezione di IL-6 da parte dei linfociti Th2 e l'azione di IL-6 che tende a promuovere l'attività di STS.

Al contrario, l'IL-1 β diminuisce sia l'espressione dell'mRNA che l'attività della STS nelle cellule endometriali e a livello vascolare della muscolatura liscia.

L'IGF-1 e il fattore della crescita dei fibroblasti, FGF, aumentano l'attività della STS in modo dose e tempo dipendente in linee cellulari del tessuto mammario

neoplastico, portando quindi ad un incremento della produzione locale di estrogeni, incremento che favorisce il tumore.

Oltre a ciò, esistono dati preliminari sull'influenza degli ormoni steroidei sull'attività dell'enzima STS. E' stato rilevato per esempio, che nel fegato e nei leucociti di ratti ovariectomizzati, la somministrazione di E1-S esogeno possa indurre l'attività della steroide solfatasi. Sempre nello stesso studio, il trattamento con promegestone (R-5020) comporta la diminuzione dei livelli di messaggero in cellule di tumore mammario MCF-7, mentre il medroxiprogesterone acetato, nelle stesse cellule, aumenta l'attività della STS, probabilmente agendo a livello della fluidità di membrana e quindi aumentando la disponibilità di substrato o inducendo l'attività di trasportatori specifici (Reed *et al.*, 2005).

10. Patologia e STS

L'enzima steroide solfatasi riveste un ruolo chiave nella steroidogenesi, processo fondamentale per la produzione di ormoni la cui mancanza comporterebbe disfunzioni all'intero organismo. La ricerca in ambito biomedico circa la patologia o patogenicità associata al gene STS ha fatto emergere diverse malattie dovute ad un innalzamento o un abbassamento dell'attività enzimatica promuovente la produzione degli steroidi.

Di seguito vengono riportate le principali alterazioni fisiologiche dovute all'uno o all'altro caso.

- **Tumori ormono-dipendenti.** In questi ultimi anni il ruolo della STS nella regolazione della crescita di tumori ormono-dipendenti, come quelli mammario ed endometriale, ha generato un notevole interesse verso la ricerca di strategie terapeutiche sempre più efficaci. Nella maggior parte dei casi clinici, questo genere di tumori si manifesta in donne in post-menopausa nelle quali la sintesi degli estrogeni deriva dall'azione di enzimi specifici a livello periferico, come per esempio l'aromatasi che media la conversione dell'AND in E1 o della STS con l'idrolisi di E1-S e di DHEA-S. Nel plasma, la forma di estrogeno maggiormente presente risulta essere l'E1-S con una concentrazione 10 volte superiore a quella della forma non coniugata E1 e di E2, costituendo quindi una riserva per la

produzione della forma attiva ad opera degli enzimi STS e 17 β -HSD a livello periferico.

Esistono due meccanismi che portano alla sintesi ed azione degli estrogeni: 1) l'uptake dalla circolazione sanguigna e legame ad alta affinità con i recettori ER; 2) sintesi in situ a partire da precursori androgenici ad opera di enzimi quali l'aromatasi e l'STS entrambi identificati a livello dei tessuti tumorali della mammella e dell'endometrio e successiva azione intracrina sui recettori ER.

Il **carcinoma mammario** è quello epidemiologicamente più diffuso nella popolazione femminile mondiale. Studi recenti hanno dimostrato come la concentrazione tissutale di E2 sia 10 volte maggiore di quella a livello plasmatico, suggerendo quindi la produzione in *situ* degli estrogeni a partire da precursori biologicamente inattivi recuperati dal sistema circolatorio per poi essere convertiti in composti attivi: l'E1, per esempio, viene formato dall'aromatasi a partire da androstenedione e da STS a partire da E1-S per poi essere convertito in E2 dalla 17 β -HSD1 e poter quindi agire sui recettori ER α e/o ER β (Suzuki *et al.*, 2003). Se da una parte l'attività dell'aromatasi risulta essere presente nel 40-60% dei casi di neoplasia mammaria, dall'altra quella della STS è presente nella maggioranza di essi. E' stato inoltre misurato che la quantità di E1, ottenuta attraverso l'azione della steroide solfatasi, è dieci volte superiore a quella dell'ormone sintetizzato grazie all'attività dell'aromatasi. Di conseguenza, le concentrazioni di E1 e di E2 nel tessuto tumorale di mammella possono essere incrementate fino a 10 volte rispetto alla concentrazione plasmatica, presentando anche alti livelli di E1-S ed E2-S.

La sintesi degli estrogeni prevede l'utilizzo di precursori come il DHEA-S che risulta essere il più abbondante tra quelli secreti dalla corteccia surrenalica e con un'emivita di 10-20 ore superiore a quella della forma non coniugata pari a 1-3 ore.

Inoltre, analisi di spettrometria di massa hanno individuato che il DHEA-S viene convertito in estrogeni a livello di cellule tumorali MCF-7. Sempre in queste stesse linee cellulari è stata riportata la capacità di DHEA-S, DHEA e AND nello stimolare la proliferazione cellulare con la possibilità di bloccarla usando antagonisti di legame con ER (per esempio nafoxidene); la proliferazione non viene invece completamente bloccata con inibitori dell'aromatasi. Al contrario,

inibitori per STS comportano il blocco completo di tale abilità. Da qui l'evidenza che androgeni adrenalici e loro metaboliti possono stimolare la crescita del tumore mammario e che l'inibizione di STS contrasti tale fenomeno in quanto comporta l'arresto della formazione di E1 da E1-S riducendo pure quella di AND tramite l'interruzione della conversione di DHEA-S in DHEA (Reed *et al.*, 2005).

Oltre alla forma tumorale ormono-dipendente mammaria, è stato dimostrato che gli estrogeni, specialmente il 17 β -estradiolo, contribuiscono allo sviluppo del **carcinoma endometriale** soprattutto in donne dopo la menopausa.

La steroide solfatasi potrebbe essere coinvolta nella produzione locale di androgeni ed estrogeni nel tessuto tumorale dell'endometrio come pure in quello mammario. E' riportato, infatti, un aumento dell'attività della STS in queste stesse sedi rispetto a condizioni sane con parallela diminuzione dei livelli dell'enzima estrone solfotransferasi che portano ad un incremento della disponibilità di estrogeni biologicamente attivi in relazione allo sviluppo del tumore ormono-dipendente.

Tutto ciò pone le basi per individuare agenti specifici per l'inibizione dell'attività della steroide solfatasi al fine di impedire l'eccessiva sintesi e azione degli estrogeni promuoventi il tumore. Viene riportato che la steroide solfatasi è fortemente espressa nell'86% dei casi di carcinoma endometriale, mentre l'enzima estrogeno solfotransferasi (EST) lo è solo nel 29%. Questo indica una diminuzione di espressione di questo ultimo enzima associata pure a quella della 17 β -HSD2 e un aumento quindi della produzione locale di estrogeni nel tessuto tumorale. Inoltre, i dati raccolti suggeriscono che non solo STS ed EST, ma anche aromatasi e 17 β -HSD2 possono contribuire indipendentemente alla regolazione della disponibilità e/o attività degli estrogeni a livello neoplastico (Utsunomiya *et al.*, 2004).

Se per i sopracitati tumori mammario ed endometriale vi è certezza sulla loro ormono-dipendenza, rimane invece da chiarirla per un'altra forma di cancro anche per la quale la presenza dell'enzima steroide solfatasi assumerebbe un valido significato prognostico. Il tumore cui ci si riferisce è quello **ovarico** che rappresenta la seconda più comune forma di tumore ginecologico. L'incidenza di questa malattia è in aumento, se ne contano intorno ai 17 casi su 100.000 per anno. Tale neoplasia, nel 60-70% delle pazienti, esordisce in età avanzata, con un

picco massimo d'incidenza fra i 55 e i 65 anni specialmente nei Paesi industrializzati.

I risultati ottenuti da numerosi lavori di ricerca suggeriscono una non irrilevante influenza dei fattori endocrini, specie degli estrogeni, in questa forma di carcinoma. Recentemente è stato condotto uno studio di rilevamento immunohistochimico dell'espressione della STS in tessuti ovarici neoplastici. Gli esiti di tali analisi risultano positivi all'espressione dell'enzima nella sede d'esame con livelli superiori al 70% facendo supporre l'ormono-dipendenza anche per questo caso tumorale. Non solo l'enzima STS ma anche l'aromatasi è presente all'interno del tumore, come pure i recettori degli estrogeni e del progesterone suggerendo quindi la possibilità che la produzione degli estrogeni abbia un effetto promuovente lo sviluppo del tumore (Okuda *et al.*, 2001). Se così fosse, dunque, l'STS diverrebbe un considerevole e affidabile fattore prognostico ed un possibile *target* terapeutico.

Nella **prostata** il testosterone è l'ormone presente a più alte concentrazioni e viene velocemente convertito in 5 α -diidrotestosterone (5 α -DHT) da parte dell'enzima 5 α -reduttasi. In tessuti prostatici tumorali rimossi o nel sangue di uomini affetti da tumore alla prostata che hanno subito un intervento di castrazione i livelli di DHT permangono elevati, portando all'ipotesi che vi sia un'altra fonte di formazione di 5 α -DHT extratesticolare; questa fonte è data dal DHEA-S. L'idrolisi del gruppo solfato del DHEA-S rende disponibili elevate concentrazioni di DHEA per la sintesi di androgeni dotati di attività ormonale e soprattutto implicati nella promozione della crescita tumorale, quali il 5 α -diidrotestosterone

Pertanto la steroide solfatasi fornisce un'elevata dose di androgeni al tessuto prostatico. Di conseguenza una sua inibizione farmacologica risulta essere una terapia di supporto nel trattamento del tumore prostatico androgeno-dipendente (Selcer *et al.*, 2002).

- **Endometriosi.** L'endometriosi è una malattia cronica e complessa, originata dalla presenza anomala del tessuto che riveste la parete interna dell'utero, endometrio, in altri organi -quali ovaie, tube, peritoneo, vagina- provocando sanguinamenti interni, infiammazioni croniche e tessuto cicatriziale, aderenze ed infertilità.

Nell'ambito della ricerca circa tale patologia, che per certi aspetti rimane ancora misteriosa, è stato riportato un primo studio sull'identificazione della proteina STS a livello delle cellule del complesso cumulo-ovocita (COC), importanti nei processi di maturazione e ovulazione della cellula uovo, riscontrando una maggiore espressione del gene codificante l'enzima in donne affette da endometriosi rispetto a quelle non ammalate.

Nonostante il contributo della STS a livello delle cellule del cumulo rimanga ancora poco chiaro, il rilevamento di alti livelli di espressione suggerisce un suo importante ruolo nella produzione degli steroidi dell'ovocita. In particolare, le analisi condotte in questo lavoro indicano quantità dell'mRNA 11,8 volte maggiori in donne con endometriosi rispetto a quelle senza. Il motivo di tali differenze quantitative potrebbe essere spiegato da dati reperibili in lavori precedenti. In particolare vi sono evidenze per le quali donne ammalate di endometriosi mostrano una minor efficienza nel processo di fecondazione forse per un'influenza negativa sull'ovocita da parte della steroidogenesi. In queste pazienti le cellule della granulosa risultano essere meno sensibili ad una stimolazione con l'ormone luteotropo (LH) che sembra avere un'azione inibente l'attività della STS (Yanaihara *et al.*, 2005). Come già riportato nel paragrafo 8, a regolare l'azione della steroide solfatasi partecipano diverse citochine come IL-6 e TNF α che la stimolano e IL-1 β che la inibisce. Solo le prime due mostrano livelli significativamente aumentati in donne con endometriosi e sembra che tali elementi possano controllare l'attività della STS nelle cellule del cumulo. Ciò che rimane da chiarire con ulteriori analisi future è l'effetto degli steroidi sull'ovocita e spiegare quindi la presenza di maggiori livelli di STS in pazienti donne con endometriosi.

- **Aterosclerosi.** Numerosi studi epidemiologici portano a individuare una bassa incidenza di fenomeni cardiovascolari in donne in pre-menopausa e un aumento marcato degli stessi, invece, dopo la menopausa. Si postula, infatti, che gli estrogeni abbiano effetti anti-aterogenici a livello vascolare della muscolatura liscia basandosi anche sull'avvenuta dimostrazione della presenza della STS in questa stessa sede. A conferma di ciò vi sono evidenze circa l'abbassamento dell'attività enzimatica della steroide solfatasi in caso di aterosclerosi; questa diminuzione sarebbe determinata da citochine come IL-1 β coinvolte localmente

nel processo infiammatorio aterosclerotico. Dal momento però che tali dati riguardano solo donne in postmenopausa, resta ancora da chiarire la situazione concernente soggetti maschili e donne in premenopausa (Nakamura *et al.*, 2003).

• **Ittiosi X-linked.** L'Ittiosi legata al cromosoma X (X-LI) è una delle più comuni malattie genetiche con un'incidenza approssimativamente di 1 su 6000 nati maschi umani in tutto il mondo (Hernandez-Martín *et al.*, 1999). Il 90% dei soggetti affetti mostra la completa delezione del gene codificante la steroido solfatasi e di regioni fiancheggianti; mentre esistono altri casi dovuti a delezioni parziali o a sette mutazioni puntiformi, di cui una non senso in posizione 427 e le altre sei di sostituzione amminoacidica Ser341Leu, Trp372Arg, Trp372Pro, His444Arg, Cys446Tyr e Gln560Pro. L'effetto di ciascuna di tali mutazioni è quello di rendere inattiva la proteina dal punto di vista catalitico. La perdita di attività non sembra essere causata da una localizzazione dell'enzima non corretta o da errate modificazioni post-traduzionali ma piuttosto da una ridotta emivita e/o da una mancanza del sito di ancoraggio per il substrato. Questa è determinata dalla mutazione non senso situata in prossimità della regione carbossi-terminale che risulta essere importante per l'ancoraggio del substrato (Ghosh, 2004).

Gravidanze di feti maschi affetti sono caratterizzate da bassi livelli di estriolo nelle urine e nel plasma della madre oltre che da elevate concentrazioni di steroidi solfato nel fluido amniotico. La carenza dell'enzima attivo comporta un parto ritardato a causa di un'insufficiente dilatazione della cervice uterina con relativo fallimento della risposta alla somministrazione di ossitocina intravenosa.

La malattia si manifesta già nelle prime settimane di vita ed è caratterizzata da desquamazione della cute con accumulo, nello strato corneo, di CHO-S, il quale sembra avere un ruolo importante nella formazione e differenziazione cutanee. In alcuni casi però lo sviluppo del feto risulta normale e ciò porta ad ipotizzare l'esistenza di una fonte di estrogeni alternativa all'estriolo derivato dal DHEA-S.

11. Regolazione dell'espressione genica data dall'uso di promotori alternativi

L'espressione genica può essere regolata nella cellula a diversi livelli: controllo della trascrizione, processamento dell'RNA, controllo della traduzione, modificazioni post-traduzionali e degradazione dell'RNA.

Solo il controllo effettuato a livello trascrizionale assicura che non vengano prodotti intermedi superflui e rappresenta quindi la principale modalità di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti. Negli eucarioti unità trascrizionali complesse possono produrre molteplici RNA messaggeri maturi che possono portare alla sintesi di proteine in qualche modo diverse sebbene correlate. Esistono 4 meccanismi di base e combinazioni degli stessi che portano alla trascrizione di messaggeri diversi a partire dallo stesso gene.

1. Uso di promotori alternativi.
2. Differenti siti di terminazione o diversi processamenti del 3'-terminale.
3. Splicing alternativo dello stesso trascritto primario.
4. Riarrangiamenti genomici.

Di particolare interesse nel nostro caso sono le implicazioni portate dall'uso di promotori alternativi, in quanto una singola regione promotoriale con i fattori trascrizionali ad essa associati, potrebbe non essere sufficiente per garantire sia una corretta espressione temporale del gene durante lo sviluppo che una corretta espressione tessuto-specifica.

La presenza e l'utilizzo di promotori differenti, in generale, portano alla trascrizione di forme di RNA messaggero che possiedono una diversa struttura primaria nella regione 5'-terminale. Nel caso del gene STS questa differenza strutturale si manifesta, come verrà evidenziato in seguito, per la presenza di distinti primi esoni collegati ad uno stesso secondo esone (Fig. 6).

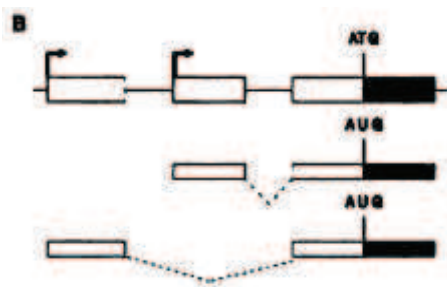


Fig. 6. Schema di come l'uso di promotori alternativi può risultare nella trascrizione di primi esoni alternativi che compiono splicing con un secondo esone comune. (Ayoubi e Van de Ven, 1996).

La funzione di promotori multipli è quella di codificare proteine che possono avere una diversa distribuzione tissutale, localizzazione cellulare, funzione o espressione temporale fornendo, in tal modo, all'organismo una maggiore flessibilità nel controllo dell'espressione genica.

Nell'ambito della ricerca sulla steroidogenesi uno degli esempi maggiormente studiati di controllo della regolazione attraverso l'uso di promotori alternativi è rappresentato dal gene CYP19 codificante l'enzima aromatasi, che catalizza la biosintesi degli estrogeni in vari tessuti tra i quali principalmente ovario, tessuto adiposo e cervello. Il gene CYP19 umano presenta differenti promotori tessuto specifici che dirigono l'espressione dell'aromatasi nella placenta, nell'ovario e nel tessuto adiposo (e non solo) attraverso eventi di splicing alternativo che coinvolgono vari esoni non tradotti nella regione 5' dei trascritti primari. La maggior parte dei trascritti placentari contengono nella loro regione 5' sequenze codificate dall'esone I.1, situato almeno 40 kb a monte del sito di inizio della traduzione, mentre solo una piccola porzione di essi (<1%) contiene sequenze codificate dall'esone I.2. Questo è dovuto al fatto che l'espressione nella placenta viene diretta da un potente promotore distale placentare (PI.1), posto a monte dell'esone I.1 (Simpson *et al.*, 1997) e regolato dai retinoidi. D'altra parte, i trascritti dell'ovario contengono nell'estremità 5' la sequenza immediatamente a monte del sito di inizio della traduzione, in quanto l'espressione del gene dipende da un promotore prossimale (PII). L'espressione dell'aromatasi nell'ovario è principalmente sotto il controllo della gonadotropina FSH, la cui azione è mediata dall'AMPC. Al contrario i trascritti del tessuto adiposo contengono un differente esone non tradotto distale, l'esone I.4, localizzato nel gene 20 kb a monte

dell'esone II. Il promotore I.4 risulta regolato dal punto di vista ormonale in quanto i trascritti corrispondenti si rinvengono soltanto in cellule trattate con glucocorticosteroidi in presenza di siero ed altri fattori di crescita.

MATERIALI E METODI

12. Campioni analizzati

Per l'estrazione di RNA, sono stati utilizzati i campioni di tessuto tumorale e sano (quando pervenuti), elencati nella tabella 1 e forniti dalle persone di seguito elencate che ci hanno aiutato nel reperire tale materiale; nello specifico dal Dr. Paolo Bernante (Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Patologia Chirurgica, Università di Padova), Dr. Luca Martella (Dipartimento di Oncologia Chirurgica, CRO Aviano), Prof. Pietro Petrin (Chirurgia Generale 4° Clinica, Azienda Ospedaliera Università di Padova), dal Prof. Federico Rea (Chirurgia Toracica Clinica, Azienda ospedaliera di Padova). Alcuni campioni ci sono stati procurati da collaboratori del Prof. Decio Armanini (Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Endocrinologia, Università di Padova). Per la maggior parte i campioni sono stati ottenuti da biopsie determinando quindi un limite alla quantità di campione da cui estrarre l'RNA.

n.	Campione	Tipo e Diagnosi	Sesso	Età
1	Cartilagine della testa del femore	Sano	F	80
		Artrosica		
2	Colon	Tumorale (N.P)	F	68
3	Colon	Tumorale (N.P)	M	62
4	Derma e bulbo pilifero	(N.P)	M	60
5	Derma e bulbo pilifero	(N.P)	F	67
6	Epiglottide	Sano	M	69
7	Fegato	Tumorale (N.P)	F	68
8	Ghiandola surrenale	Tumorale (N.P)	F	30
9	Ileo	Tumorale (N.P)	M	67
10	Linfomonociti (LMN)	/	M	N.P.
11	Linfomonociti (LMN)	/	M	N.P.
12	Mammella	Tumorale (N.P)	F	48
13	Mammella	Tumorale (N.P)	F	47
14	Mammella	Tumorale (N.P)	F	50
15	Mammella	Sano	F	45
		Tumorale (carcinoma globulare infiltrante)		

MATERIALI E METODI

16	Mammella	Sano	F	46
		Tumorale(carcinoma infiltrante multifocale)		
17	Mammella	Sano	F	63
		Tumorale(carcinoma infiltrante)		
18	Ovaio	Tumorale (N.P.)	F	N.P.
19	Ovaio	Tumorale (carcinoma sieroso scarsamente differenziato)	F	34
20	Ovaio	Sano	F	N.P.
		Tumorale (N.P.)		
21	Ovaio	Sano	F	N.P.
		Tumorale (N.P.)		
22	Pancreas	Tumorale (N.P.)	M	70
23	Placenta	Sano	F	N.P.
24	Pelle	Sano	F	N.P.
25	Pelle	Sano	F	N.P.
26	Polmone	Sano	M	67
		Tumorale (cancro solido, neoformazione lobo superiore)		
27	Sperma	/	M	40
28	Timo	Sano	F	43
		Tumorale (timoma)		
29	Tiroide	Tumorale (N.P.)	F	N.P.
30	Utero	Tumorale (N.P.)	F	N.P.
31	Utero	Sano	F	54
		Tumorale (adenocarcinoma endometriale moderato differenziato del corpo uterino)		

Tab. 1. Campioni dei tessuti esaminati. N.P.= non pervenuta

Inoltre, ci sono state fornite alcune colture cellulari di carcinoma prostatico (vd. tabella 2): LNCap fornita dal Dr. Stefano Ugel (Istituto Oncologico Veneto I.R.C.C.S, Immunologia Diagnostica Molecolare Oncologica, Padova) e DU-145 e PC-3 dal Dr. Giulio Fracasso (Dipartimento di Patologia, Immunologia; Università di Verona).

<i>n.</i>	<i>Linea cellulare</i>	<i>Tipo cellulare</i>
32	LNCap	carcinoma prostatico
33	DU-145	carcinoma prostatico
34	PC-3	carcinoma prostatico

Tab. 2. Linee cellulari di carcinoma prostatico.

Ai fini dell'estrazione dell'RNA totale, i campioni di tessuto vengono congelati in azoto liquido e successivamente posti a -80°C oppure immersi in RNA *later* (Ambion), un prodotto in grado di preservare l'RNA, sia a temperatura ambiente che a basse temperature, per periodi variabili.

Le cellule, invece, immerse in 1 ml di medium (RPMI), vengono congelate a -80°C , e successivamente, al momento dell'estrazione, centrifugate e poi risospese con 1 ml di reagente TRIzol (Invitrogen, Milano).

13. Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il prodotto TRIzol della ditta Invitrogen (Milano, Italia).

Durante le varie fasi di estrazione e di manipolazione dell'RNA il lavoro deve essere svolto sotto cappa chimica, usando vetreria sterilizzata o trattata a 200°C in stufa per l'intera notte.

Reagenti

- TRIzol (Invitrogen)
- Cloroformio
- Isopropanolo
- Etanolo 70%

Procedimento

Per l'estrazione dell'RNA da tessuto, 100 mg di esso vengono polverizzati in un mortaio mediante l'utilizzo di un pestello e continuamente raffreddati con azoto liquido. Successivamente vengono addizionati con 1 ml di TRIzol. Nel caso, invece, delle cellule ($5-10 \times 10^6$), come già accennato nel paragrafo precedente,

queste vengono centrifugate e poi risospese con 1 ml di reagente TRIzol. L'omogenato viene quindi trasferito in una *ependorf* da 1,5 ml, e addizionato con 200 µl di cloroformio; l'*ependorf* viene agitata per 15 sec e poi lasciata in ghiaccio per 15 min. Al termine di questo periodo di incubazione il campione viene centrifugato per 15 min a 4°C a 12000 g. In questo modo si ottengono due fasi separate da un anello bianco. Si preleva la fase acquosa sovrastante, la si trasferisce in una nuova *ependorf*, e si aggiunge un uguale volume di isopropanolo. Il tutto viene lasciato O/N o per almeno 2 h a -20°C per consentire la precipitazione dell'RNA. Il campione viene poi centrifugato nuovamente per 15 min a 4°C ed il *pellet* così ottenuto, dopo la rimozione del surnatante, viene lavato con 500 µl di etanolo 70% freddo (conservato a -20°C). Quindi si centrifuga, sempre per 15 min a 4°C, si rimuove l'etanolo, e si procede con un secondo lavaggio per meglio purificare l'RNA, utilizzando ancora etanolo 70%. Dopo un'ulteriore centrifugazione si rimuove l'etanolo e si lascia asciugare il *pellet* a temperatura ambiente, in modo tale che l'alcool evapori totalmente. A questo punto, il sedimento viene risospeso con 20-50 µl di acqua milliQ, a seconda della quantità di RNA sedimentato, e poi congelato.

13.1. Purificazione dell'RNA totale estratto

E' stata condotta un'ulteriore purificazione dell'RNA totale mediante l'utilizzo del kit della QIAGEN (RNeasy® Mini Kit).

Reagenti

- *Buffer* RTL
- *Buffer* RPE
- β Mercaptoetanolo
- H₂O priva di RNasi
- Etanolo assoluto

Procedimento

La soluzione dell'RNA da purificare viene portata ad un volume di 100 µl con H₂O. Successivamente vengono aggiunti 350 µl di miscela *buffer* RTL addizionata

di 3,5 μl β Mercaptoetanolo, si mescola bene e si aggiungono 250 μl di etanolo assoluto. L'intera soluzione viene trasferita in una colonnina posta all'interno di una *eppendorf* per poi essere centrifugata per 15 sec a ≥ 8000 g. Dopo aver svuotato l'eluato, la colonnina con ancorato l'RNA, viene posta in una nuova *eppendorf*, addizionata di 500 μl di *buffer* RPE e nuovamente centrifugata per 15 sec a ≥ 8000 g per lavare la colonnina. Si ripete quest'ultimo passaggio una seconda volta centrifugando per un tempo superiore ai 2 min e successivamente si esegue una centrifugazione a secco in modo tale che tutto il liquido di lavaggio fuoriesca. Infine si eluisce l'RNA ancorato alla membrana con 30-50 μl di H_2O milliQ.

13.2. Controllo della qualità dell'RNA mediante gel elettroforesi

Un controllo qualitativo sull'RNA estratto viene effettuato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1% (vd. Paragrafo 17). 1 μl di RNA totale viene diluito con H_2O milliQ e *buffer* di caricamento. A questo punto i campioni vengono caricati su gel di agarosio. In seguito alla corsa elettroforetica risultano visibili al transilluminatore due bande: una, più alta, corrispondente all'rRNA 28S, l'altra, più bassa, corrispondente all'rRNA 18S. La presenza, invece, di uno striscio (*smear*) è indice di una avvenuta degradazione dell'RNA.

13.3. Quantificazione dell'RNA

La concentrazione dell'RNA viene determinata attraverso l'analisi spettrofotometrica, che consente inoltre una valutazione del suo stato di purezza o contaminazione proteica.

Procedimento

Si esegue la misurazione di 1 μl di RNA diluito con acqua milliQ in un volume finale di 50 μl , determinando l'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Si risale alla concentrazione di RNA utilizzando la relazione:

1 unità di O.D. = 40 µg/ml di RNA

Poiché le proteine hanno un massimo di assorbimento a 280 nm, misurando l'assorbanza della soluzione anche a questa lunghezza d'onda, si può valutare l'entità di una eventuale contaminazione proteica nel campione.

Il preparato viene considerato privo di proteine contaminanti se:

$$\frac{O.D._{260}}{O.D._{280}} \geq 1,8$$

14. Trascrizione inversa dell'RNA con *random* esameri

L'RNA totale viene retrotrascritto in cDNA grazie all'enzima Trascrittasi inversa utilizzando come *primer* una miscela di esanucleotidi. Per tale reazione è stato usato il kit "*ThermoScript™ RT-PCR System*" (Invitrogen).

Viene preparata una provetta contenente:

- *Random* esameri (10 ng/µl) 1 µl
- dNTPs Mix (10 mM) 2 µl
- RNA x*
- H₂O fino a 12 µl

* viene utilizzato un volume corrispondente a 2 µg di RNA

Successivamente l'RNA viene denaturato ponendo la provetta a 65°C per 5 min.

Nel frattempo viene preparata una seconda miscela per la sintesi del cDNA:

- cDNA *Synthesis Buffer* 5X 4 µl
- DTT (0,1 M) 1 µl
- *RNase* OUT™ 1 µl
- *ThermoScript*™ 1 µl
- H₂O 1 µl

Trascorsi i 5 minuti, gli 8 μ l della miscela per la sintesi del cDNA vengono trasferiti all'interno delle provette contenenti i campioni.

I campioni vengono quindi trasferiti nel termociclatore con le seguenti condizioni:

Legame degli esameri all'RNA	25°C	10 min
Reazione di retrotrascrizione	55°C	45 min
Inattivazione dell'enzima	85°C	5 min

Tab. 3. Condizioni di retrotrascrizione.

Successivamente viene aggiunto ad ogni reazione 1 μ l di RNasi H, per degradare l'RNA rimasto, lasciando incubare a 37 °C per 20 min.

I campioni infine vengono conservati a -20°C.

15. Trascrizione inversa con *primer* RT specifici

L'RNA totale viene retrotrascritto in cDNA ad opera dell'enzima Trascrittasi inversa M-MLV (Promega).

Viene preparata una provetta contenente:

- RNA x*	μ l
- <i>primer</i> RT specifici (1 μ M) (vd. tabella 6)	1 μ l
- H ₂ O fino a 15	μ l

* viene utilizzato un volume corrispondente a 2 μ g di RNA

La provetta viene messa ad incubare per 5 min a 70°C al fine di denaturare l'RNA.

<i>Oligonucleotide</i>	<i>Sequenza</i>
STS-14 oligo 3'	5'-AGGGTGGTGACAGAAGTCAGTC-3'
STS-16 oligo 3'	5'-CTTGATGCTGCGTGGCTCTC-3'
STS-1bR oligo 3'	5'-GTGCAGGTTTCAGCAACTGAG-3'

Tab. 4. Oligonucleotidi RT specifici.

Successivamente, si aggiungono 10 μ l della seguente miscela:

- M-MLV <i>Reaction Buffer</i> 5X	5 μ l
- dNTPs (10 mM)	1,25 μ l
- <i>Recombinant RNasin</i> [®] <i>Ribonuclease Inhibitor</i>	25 U
- M-MLV RT	200 U
- H ₂ O	fino a 10 μ l

In questo modo si raggiungono 25 μ l totali di reazione di retrotrascrizione.

16. Amplificazione del DNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR è una reazione enzimatica, condotta *in vitro*, utilizzata per produrre molte copie di uno specifico frammento di DNA.

La reazione avviene tramite ripetuti cicli costituiti da tre fasi distinte:

- denaturazione termica del DNA stampo,
- appaiamento dell'oligonucleotide alla sequenza complementare del DNA stampo,
- estensione dell'oligonucleotide con sintesi di una nuova catena di DNA complementare a quella dello stampo, mediante l'uso di una polimerasi termostabile, *Taq* DNA polimerasi.

Reagenti

Viene riportata la concentrazione finale dei reagenti:

- Buffer Biotherm 10X	1X
- MgCl ₂	da 1,5 a 2 mM
- dNTPs Mix	0,2 mM
- Oligonucleotide 3'	0,2 μ M
- Oligonucleotide 5'	0,2 μ M
- <i>Taq</i> DNA polimerasi <i>Biotherm</i>	1,25 U
- cDNA stampo	x μ l
- H ₂ O milliQ	fino a 25 μ l

Parametri fisici della reazione

Pre-denaturazione	95°C	2 min	
Denaturazione	95°C	30 sec	} 35-40 cicli
Appaiamento	variabile	30 sec	
Estensione	72°C	variabile	
Estensione finale	72°C	20 min	
Terminazione	10°C	2 min	

Oligonucleotide		Sequenza
STS-1	oligo 5'	5' -CTGACTTCTGTCACCACCCT-3'
STS-2	oligo 3'	5' -GTCCATGTTGCTAGTGGGCT-3'
STS-4	oligo 3'	5' -AGGGTCAGGATTAGGGCTGCT-3'
STS-6	oligo 3'	5' -AGGTGCTGAGTGAGTTTCACT-3'
STS-10	oligo 3'	5' -CAGTAGGAGGAAAGGGATCT-3'
STS-0a	oligo 5'	5' -GAGAACCGCTACCATGCAG-3'
STS-0b	oligo 5'	5' -GAAGAAGTCCGTCCATGTCA-3'
STS-0c	oligo 5'	5' -TGAAGGAGACGTACAAAGTGT-3'
STS-1a	oligo 5'	5' -CAGCTGTAGTGAGGTTGCA-3'
STS-1c	oligo 5'	5' -CAGTTGCTGGGAGAGGTGT-3'
STS-1d	oligo 5'	5' -TCAAAGGAAGCAGGTTGCTGGA-3'
STS-1e	oligo 5'	5' -TGGACACCTTGGGCTGAGTC-3'
Q-Beta-1	oligo 5'	5' -CACCAACTGGGACGACATGGAG-3'
Q-Beta-2	oligo 3'	5' -GGCCTGGATGGCCACGTACAT-3'

Tab. 5. Elenco degli oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di RT-PCR e 5'-RLM-RACE.

Gli oligonucleotidi Q-Beta-1 e Q-Beta-2, che permettono l'amplificazione del cDNA codificante la β -actina, vengono utilizzati come controllo positivo al fine di verificare di aver ottenuto un buon cDNA con la reazione di retrotrascrizione.

Gene <i>target</i>	Coppia oligonucleotidi	[Mg ⁺⁺]	Temperatura di <i>annealing</i> (°C)	Tempo di estensione (sec)
STS	STS-1 – STS-2	2 mM	56	40
STS	5'-RACE <i>outer</i> – STS-4	2 mM	<i>Touch down</i> 58-52	60
STS	5'-RACE <i>outer</i> – STS-6	2 mM	<i>Touch down</i> 58-52	60
STS	5'-RACE <i>inner</i> – STS-6	2 mM	58	30
STS	5'-RACE <i>inner</i> – STS-10	2 mM	58	30
STS	STS-0a – STS-6	2 mM	58	20
STS	STS-0b – STS-6	2 mM	58	20
STS	STS-0c – STS-6	2 mM	<i>Touch down</i> 58-52	20
STS	STS-1a – STS-6	2 mM	58	20
STS	STS-1c – STS-6	2 mM	<i>Touch down</i> 58-52	20
STS	STS-1d – STS-6	2 mM	<i>Touch down</i> 58-52	20
STS	STS-1e – STS-6	2 mM	58	20
β -actina	Q-Beta-1 – Q-Beta-2	1,5 mM	60	15

Tab. 6. Geni *target*, oligonucleotidi e condizioni utilizzati nelle reazioni di RT-PCR e 5'-RLM-RACE.

17. Analisi dei prodotti di amplificazione mediante separazione in gel di agarosio

La reazione di amplificazione viene verificata prelevando 10 μ l di campione che, dopo aggiunta del colorante di caricamento, vengono sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1%, in parallelo con una scala di riferimento. L'elettroforesi in gel di agarosio consente la separazione di frammenti di DNA in base al loro peso molecolare e alla loro forma. La scelta della concentrazione del gel viene operata a seconda della lunghezza dei frammenti di DNA da analizzare. Con il gel di agarosio si possono separare sequenze che vanno da 70 pb (agarosio 3%) fino a 80000 pb (agarosio 0,1%). Anche il potere risolutivo del gel dipende dalla sua concentrazione.

Reagenti e materiale utilizzato

Agarosio

Tampone di corsa TAE 10X

Tris base 48,4 g

Acido acetico 11,4 ml

EDTA 0,5 M pH 8 20 ml

Portare a 1 l con H₂O distillata

Bromuro di etidio 10 mg/ml

Tampone di caricamento 10X

Blu di xilene/bromofenolo 0,25%

Glicerolo 5 ml

H₂O distillata 5 ml

- Soluzione di DNA di riferimento
- Apparecchio per elettroforesi
- Alimentatore
- Transilluminatore a luce UV

Procedimento

L'agarosio viene sciolto nel tampone di corsa TAE 1X mediante riscaldamento fino ad ebollizione. Il gel viene quindi versato in un'apposita vaschetta munita di pettine per la formazione dei pozzetti in cui verranno caricati i campioni. Dopo la solidificazione del gel si versa il tampone di corsa 1X nella camera elettroforetica e si rimuove il pettine.

Ai campioni da analizzare viene aggiunto il tampone di caricamento (1/10 rispetto al volume da caricare) in cui è presente il colorante blu di bromofenolo o xilene che, co-migrando con molecole di DNA di 500 o 1000 pb rispettivamente, permette la visualizzazione della corsa elettroforetica. Come scala di riferimento per i pesi molecolari si fanno correre, in parallelo ai campioni, alcuni µl di DNA *standard*.

Durante la corsa elettroforetica viene applicato un campo elettrico di circa 5 volt/cm, controllando che il gel non si surriscaldi troppo.

La colorazione del DNA si effettua con bromuro di etidio, molecola che intercalandosi fra le basi del DNA ne permette la visualizzazione dopo

esposizione a raggi UV (250-320 nm), in quanto assorbe la luce a queste lunghezze d'onda e la riemette per fluorescenza a 590 nm. A seconda delle esigenze l'etidio bromuro può essere aggiunto all'agarosio disciolto nel tampone da corsa prima di essere versato nella camera elettroforetica, oppure può venire utilizzato al termine della corsa elettroforetica in soluzione acquosa in cui si immerge il gel; in entrambi i casi la concentrazione finale è di 0,5 µg/ml.

18. Amplificazione rapida della porzione terminale al 5' del cDNA mediata da ligasi: 5' RLM-RACE

La tecnica di 5'-RLM-RACE (*RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends*) permette di amplificare, utilizzando la reazione di PCR, la regione di cDNA compresa tra un sito interno conosciuto e la parte terminale 5' di un determinato trascritto. Per eseguire questa tecnica è stato utilizzato il kit “*FirstChoice*® RLM-RACE” della ditta Ambion (Austin, US), seguendo le istruzioni riportate nel protocollo perfezionato della RACE classica (figura 7).

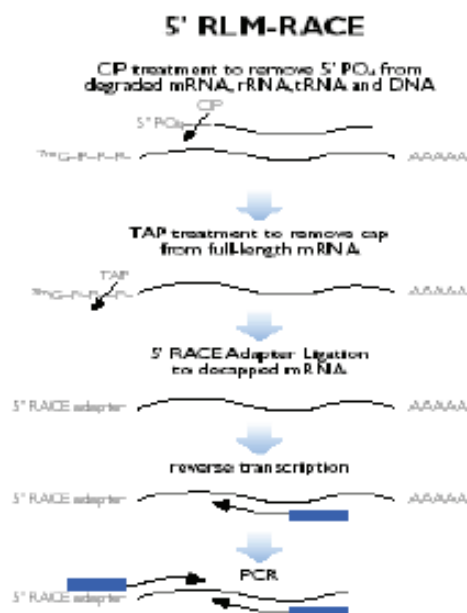


Fig. 7. Schema riassuntivo della tecnica di 5' RLM-RACE (immagine ripresa dal libretto informativo del prodotto).

18.1. Trattamento con CIP (fosfatasi alcalina di vitello)

Questo passaggio permette di selezionare, per la retrotrascrizione, in modo specifico le molecole di mRNA non degradate, scartando gli altri RNA. A tale scopo l'RNA totale viene trattato con l'enzima CIP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, fosfatasi alcalina di vitello), che rimuove il gruppo fosfato al 5' dalle molecole di RNA ribosomale, RNA *transfer*, RNA incompleti e DNA genomico che potrebbe aver contaminato il campione. L'enzima CIP non intacca il cappuccio metilato dell'RNA messaggero completo.

Reagenti

- RNA totale	10 µg
- CIP <i>Buffer</i> 10X	2 µl
- Fosfatasi alcalina di vitello (CIP)	2 µl
- H ₂ O	fino a 20 µl

La provetta con i reagenti viene incubata a 37°C per 1 ora. Terminata l'incubazione, l'RNA viene purificato dalla miscela di reazione con il metodo fenolo:cloroformio aggiungendo i seguenti reagenti alla provetta:

Soluzione di ammonio acetato	15 µl
H ₂ O	115 µl
Fenolo acido (pH 4,5) : Cloroformio	150 µl

Il tutto viene mescolato accuratamente e centrifugato alla massima velocità in una microcentrifuga per 5 min a temperatura ambiente.

La fase acquosa superiore, contenente l'RNA, viene trasferita in una nuova provetta e addizionata di 150 µl di cloroformio, mescolata e centrifugata nuovamente per altri 5 min alla massima velocità. La fase acquosa viene nuovamente trasferita in una nuova provetta, addizionata di 150 µl di isopropanolo per far precipitare l'RNA e posta a -20°C per 10 min. La provetta viene poi centrifugata per 20 min alla massima velocità. Il *pellet* viene quindi risospeso in 500 µl di etanolo 70% freddo e centrifugato per 5 min alla massima

velocità. Si scarta il surnatante e si lascia asciugare il *pellet*. Infine il precipitato viene risospeso in 11 μ l di H₂O.

18.2. Trattamento con TAP (pirofosfatasi acida di tabacco)

A questo punto si esegue il trattamento con l'enzima TAP (*Tabacco Acid Pyrophosphatase*, pirofosfatasi acida di tabacco), che rimuove il cappuccio delle molecole di mRNA, lasciando un gruppo monofosfato libero al 5', necessario per la successiva tappa di ligazione dell'adattatore al 5' dell'mRNA.

Reagenti

- RNA trattato con CIP	5 μ l
- Pirofosfatasi acida di tabacco (TAP)	2 μ l
- TAP <i>buffer</i> 10X	1 μ l
- H ₂ O	2 μ l

Il campione viene incubato a 37°C per un'ora.

18.3. Ligazione dell'adattatore al 5'

Una volta rimosso il cappuccio, al 5' monofosfato dell'RNA viene legato un oligonucleotide adattatore di 45 pb.

5' RACE Adattatore

5' -GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA- 3'

Reagenti

- RNA trattato con CIP/TAP	2 μ l
- 5' RACE Adattatore (0,3 μ g/ μ l)	1 μ l
- RNA <i>Ligase Buffer</i> 10X	1 μ l
- T4 RNA <i>Ligase</i> (2,5 U/ μ l)	2 μ l
- H ₂ O	4 μ l

Il campione viene incubato a 37°C per un'ora.

18.4. Reazione di retrotrascrizione

Una volta legato l'adattatore, viene eseguita una reazione di retrotrascrizione al fine di ottenere il cDNA necessario per le successive reazioni di PCR.

Reagenti

- RNA legato all'adattatore	2 μ l
- dNTPs Mix (2,5 mM)	4 μ l
- <i>Random</i> decameri (50 μ M)	2 μ l
- RT <i>Buffer</i> 10X	2 μ l
- Inibitore di RNasi (10 U/ μ l)	1 μ l
- M-MLV Trascrittasi inversa	1 μ l
- H ₂ O	fino a 20 μ l

Il campione viene incubato a 42°C per un'ora.

18.5. Prima PCR

Per le reazioni di PCR è stato impiegato l'enzima *Taq* polimerasi della *Biotherm*, la stessa utilizzata per tutte le PCR effettuate, e due oligonucleotidi 5', forniti dal kit, che si legano alla sequenza del 5' RACE adattatore e si trovano uno a monte (5' RACE *outer*) rispetto all'altro (5' RACE *inner*).

5'-RACE *outer*: 5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'

5'-RACE *inner*: 5'-GCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'

Questi oligonucleotidi 5' vengono accoppiati con gli opportuni oligonucleotidi 3' specifici per il gene in esame. Viene eseguita una prima PCR utilizzando l'oligonucleotide 5'-RACE *outer* e l'oligonucleotide 3' specifico per il gene di interesse posizionato più a valle. Il prodotto della prima PCR viene nuovamente amplificato, dopo opportuna diluizione, con una *Nested-PCR* utilizzando l'oligonucleotide 5'-RACE *inner* e l'oligonucleotide 3' specifico posto a monte rispetto a quello usato per la prima PCR. In alcuni casi è necessaria una terza PCR.

19. Estrazione e purificazione del DNA da gel d'agarosio

Per la purificazione dei prodotti di PCR dal gel di agarosio è stato utilizzato il kit “*Zymoclean Gel DNA Recovery KitTM*” della *Zymo Research Corporation*. L'estrazione e la purificazione dei frammenti di DNA si basano sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul legame selettivo degli acidi nucleici alla matrice della colonnina Zymo-Spin I.

Reagenti

- ADB (*Agarose Dissolving Buffer*) *Buffer*
- DNA *Wash Buffer solution* (6 ml DNA *Wash Buffer* + 24 ml etanolo assoluto)

Procedimento

Viene preparato un gel di agarosio. Nei pozzetti, più larghi del normale, si caricano i campioni e alla fine della corsa con un bisturi si ritagliano le zone del gel contenenti la banda d'interesse e si inseriscono in una provetta pulita.

Vengono aggiunti 300 µl di ADB *buffer* per ogni 100 mg di gel. Le provette vengono incubate a 50°C per 10 min, agitandole ogni 2-3 min per facilitare lo scioglimento del gel. La soluzione così ottenuta viene trasferita in una colonnina che a sua volta è posta all'interno di una provetta.

Il campione viene quindi centrifugato per 30-60 sec alla massima velocità in una microcentrifuga.

Dopo aver eliminato il surnatante, il campione viene risospeso in 200 µl di DNA *Wash Buffer solution* e centrifugato come sopra.

Di nuovo viene eliminato il surnatante ripetendo il lavaggio.

Dopo l'ultima centrifugazione, per l'eluizione del DNA vengono aggiunti alla provetta 6-10 µl di acqua milliQ. Si lascia incubare per 1 minuto a temperatura ambiente. Il campione viene nuovamente centrifugato per 60 sec alla massima velocità e si recupera il surnatante contenente il DNA purificato.

20. Quantificazione in gel di agarosio

Per determinare la concentrazione di un campione di DNA se ne preleva un'aliquota e la si fa correre in un gel di agarosio all'1% in parallelo con una scala

di DNA a concentrazione nota (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen). Dal confronto della luminosità delle bande dei campioni con quelle del *ladder* è possibile stimarne la concentrazione.

21. Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA è stato eseguito presso il servizio di sequenziamento del DNA di BMR-Genomics (via Re di Puglia, Padova).

Per la reazione di sequenziamento si prepara una miscela contenente il *primer* (3,2 pmoli) ed una certa quantità di DNA scelta in base alla lunghezza del template e al tipo di DNA (DNA in doppia o in singola elica, plasmidico o da PCR). Si pone la miscela in una provetta da sequenziamento, si porta a secco a 65°C e poi si consegna al centro di sequenziamento.

22. Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)

Al fine di analizzare da un punto di vista qualitativo e quantitativo l'espressione delle diverse varianti trascrizionali del gene STS è stata scelta una recente metodica, la MLPA ossia *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, sperimentata per la prima volta nel 2002 dal gruppo ideatore della MRC-Holland di Amsterdam (Schouten *et al.*, 2002). Questa tecnica si propone come possibile alternativa ad altre metodiche già da tempo consolidate come per esempio la *Real Time PCR* la quale permette il monitoraggio delle reazioni di PCR in “tempo reale” (Lekanne Deprez *et al.*, 2002). La MLPA si presenta come una metodologia adattabile a diverse applicazioni: identificazione del numero delle copie mediante l'amplificazione simultanea di un massimo di 45 sequenze diverse mediante l'uso di una singola coppia di primer (Schouten *et al.*, 2002; Bunyan *et al.*, 2004); individuazione di delezioni o duplicazioni geniche, di aberrazioni cromosomiche e di mutazioni puntiformi; analisi dello stato di metilazione del DNA, e quantificazione relativa dell'mRNA.

Si basa sull'ibridazione alla sequenza bersaglio di due sonde oligonucleotidiche affiancate che verranno unite da una ligasi termostabile. All'estremità queste due sonde contengono sequenze complementari alla coppia di primer successivamente

utilizzati nella PCR. Le sonde complementari alla sequenza *target* vengono scelte in modo da ottenere amplificati di lunghezze diverse (almeno 4 basi di differenza) oppure la differente lunghezza del prodotto terminale di PCR può essere creata dall'inserimento di sequenze note come sequenze “*stuffer*” che non hanno nessuna relazione con la sequenza bersaglio ma servono solo ad ottenere lunghezze diverse e specifiche per ogni gene *target* (vedi figura sotto). I prodotti di amplificazione vengono quindi separati per elettroforesi e analizzati visivamente o mediante lettore ottico in quanto il primer senso per la reazione di PCR viene marcato con un fluorocromo in posizione 5'. L'altezza e l'ampiezza del picco ottenuto è proporzionale alla concentrazione della sequenza bersaglio presente nel campione. In particolare, per i nostri studi, è stato seguito il protocollo della RT-MLPA per procedere con un'analisi qualitativa e quantitativa utilizzando l'RNA estratto dai campioni recuperati.

Come gene housekeeping per la successiva normalizzazione dei dati è stato usato il gene codificante per la β -2-microglobulina (B2M) .

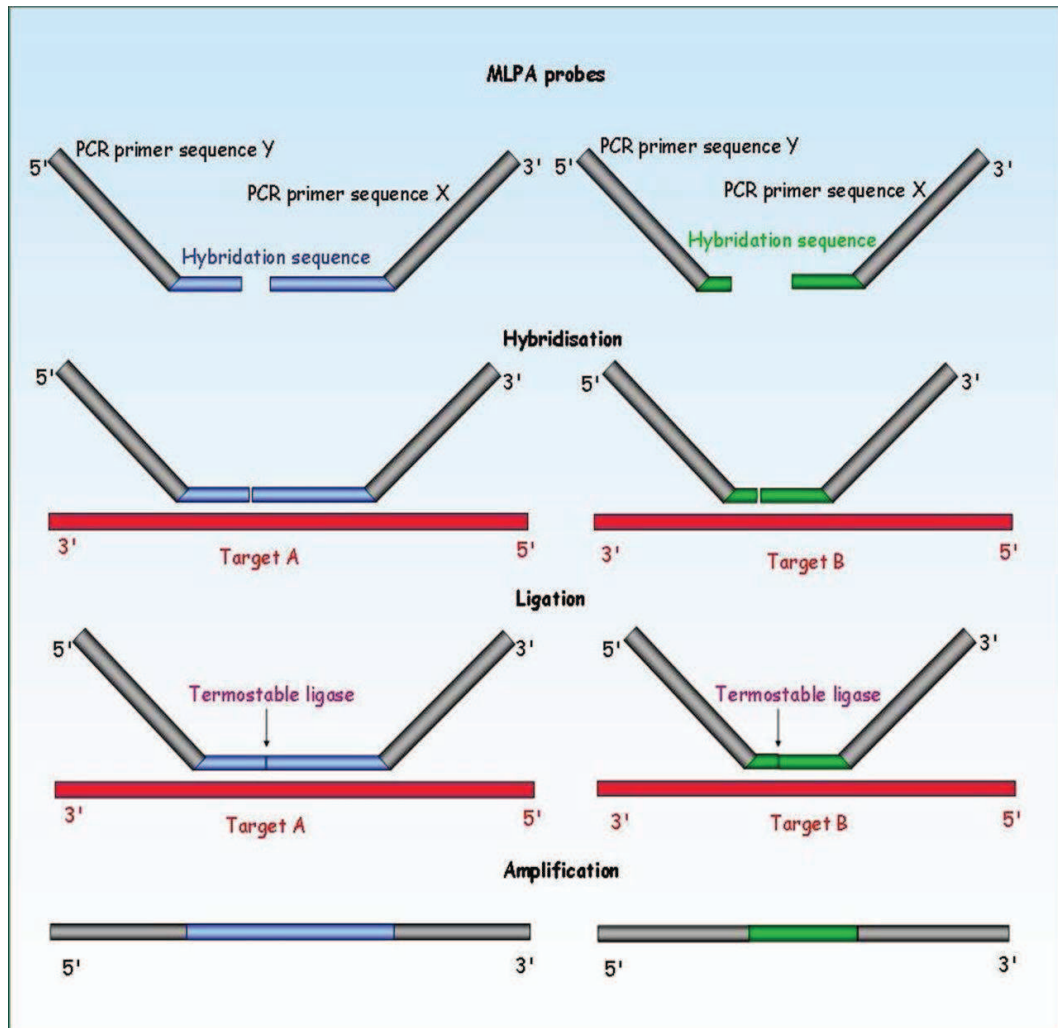


Fig. 8. Schematizzazione del funzionamento dell'MLPA. a) ciascuna semi-*probe* ha una differente lunghezza; b) le due regioni di ciascuna semi-*probe* ibridizzano a zone adiacenti della sequenza *target*; c) le due regioni ibridizzate di ciascuna semi-*probe* sono unite mediante ligazione; d) i prodotti di amplificazione vengono separati tramite elettroforesi; le quantità relative delle *probe* amplificate riflettono il numero di copie relative delle sequenze *target* (Schouten *et al.*, 2002).

La RT-MLPA prevede la successione di quattro *step*, retrotrascrizione dell'mRNA, ibridazione delle sonde, ligazione delle sonde e amplificazione mediante PCR del frammento di cDNA specifico di interesse.

Per l'esecuzione di queste analisi abbiamo selezionato coppie di sonde specifiche per ognuno dei differenti trascritti identificati per il gene STS, nonché una coppia di sonde disegnate all'interno della regione codificante.

Il kit utilizzato è EK1-RT (MRC-Holland), specifico per la RT-MLPA per la quale sono state miscelate le differenti sonde ibridanti specifiche porzioni del gene STS.

Reagenti

- *Probe mix* (vd. tabella 7)
- *MLPA buffer*
- *Ligase 65 mix* (*Ligase 65 buffer A*, *Ligase 65 buffer B*, H₂O, *Ligase 65*)
- *SALSA PCR buffer*
- *Polymerase mix* (*SALSA polymerase*, H₂O, *SALSA PCR primer*, *SALSA enzyme dilution buffer*)
- H₂O sterile

Hemi - Probe	sequenze
RPO-ex2	5' P-GAAGATCCCTTTCCTCCTACTGT TCCTCTAGATTGGATCTTTGCTGGCAC -3'
RPO-ex5	5' P-GAAATGGCACCTTGGGATGAGCTG TCCTCTAGATTGGATCTTTGCTGGCAC -3'
RPO-ex1b	5' P-AGCCCGATGCCCTTGGTTTGACTCTACTAAGAGC TCCTAGATTGGATCTTTGCTGGCAC -3'
RPO-B2M	5' P-CTCCAAAGATTTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAG TCCTAGATTGGATCTTTGCTGGCAC -3'
LPO-ex0a	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAC ATCAAAGTGGCCACACAGCAGCAACCTTTGGAGCAGGCAGGAAG-3'
LPO-ex0b	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAG GCACACTACCCACCCAGAAAGTCCGTCCATGTCAAAGATGAGGAAG-3'
LPO-ex0c	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAC TTGAGTCTTCCAGTAAAGAGCCCTCTCTCTGAAAAGCCCTTGTAAGAACTGGAAG-3'
LPO-ex1a	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAC ACAAGCTGGAGATGCCCTTTAAGGAAGA-3'
LPO-ex1b	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAG CAAGATCGTCTTCAGCTGTTTCATAGCGAAGA-3'
LPO-ex1c	5' - GGTTCCCTAAGGGTTGGAG GGTGGAAAGACTAGAAAGGACATCGATATTGAGAAGA-3'
LPO-ex1d	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAC CTGTTATTCTTACAAGGAA TGAAA TGCAGTGGAGGAAGA-3'
LPO-ex1e	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAC TGTAATTTGGACACCTTGGCTGAGTCACTTTCACTGTCTTAGGAAGA-3'
LPO-ex4	5' - GGGTTCCCTAAGGGTTGGAG CTAAAGCTTCTGAAGGATCAAGGTTATTCAAACAGCACTGATAGG-3'
LPO-B2M	5' - GGGTTGCCCTAAGGGTTGGA CCTTAGCTGTGCTGGCTACTCTCTCTTTCTGGCCCTGGAGGCTATCCAGCGTA-3'

Tab. 1. Oligonucleotidi costituenti la *Probe mix*. Gli oligonucleotidi che ibridizzano la parte sinistra del frammento *target* sono contrassegnati con LPO (*Left Probe Oligo*) mentre quelli che ibridizzano il frammento a destra vengono siglati RPO (*Right Probe Oligo*). Questi ultimi sono fosforilati in posizione 5' per consentire la reazione di ligazione. In grassetto-corsivo vengono evidenziate le regioni complementari ai *primer* utilizzati nella reazione di PCR.

Procedimento

All'interno di una provetta da 0,2 ml si pone un'aliquota di cDNA (10-500 ng) della reazione di RT eseguita con *random* esameri o con *primer* specifici (vd. paragrafi 14 e 15 rispettivamente). Si aggiunge al cDNA 1,5 µl di *Probe mix*, contenente 4 fmoli di ciascun oligonucleotide (*semi-probe*), e 1,5 µl di *MLPA buffer*; si mescola accuratamente senza centrifugare e successivamente si denatura il campione per 1 min a 95°C. A questo punto lo si incuba per 16 ore a 60°C per permettere l'ibridazione delle sonde alle specifiche sequenze esoniche del gene STS.

La reazione di ligazione degli oligonucleotidi ibridanti la sequenza *target* viene effettuata, trascorse le 16 ore, diluendo i campioni in un volume finale di 40 µl con 32 µl di *Ligase 65 mix* (3 µl di *Ligase 65 buffer A*, 3 µl di *Ligase 65 buffer B*, 25 µl H₂O, 1 µl di *Ligase 65*) e incubando a 54°C per 15 min. L'inattivazione termica dell'enzima ligasi avviene mediante riscaldamento a 98°C per 5 min. Successivamente, 10 µl di tale reazione di ligazione vengono diluiti con 30 µl di una miscela di reazione costituita da 4 µl *SALSA PCR-buffer* e 26 µl di H₂O sterile per effettuare la reazione di amplificazione.

Mentre il campione raggiunge nel termociclatore la temperatura di 60°C, vengono aggiunti 10 µl di una soluzione contenente 2 µl di *PCR-primer* (10 pmoli), 2 µl di *SALSA Enzyme Dilution buffer*, 5,5 µl di H₂O e 0,5 µl di *SALSA Polymerase*.

L'unica coppia di *primer* utilizzata per questa miscela è costituita da un *Forward-primer* marcato con fluorescente 6-FAM (*) e da un *Reverse-primer* non marcato, le cui sequenze sono rispettivamente:

*5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'

5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'

La PCR è stata effettuata con il seguente programma di amplificazione:

Denaturazione	95°C	30 sec	}	35 cicli
Appaiamento	60°C	30 sec		
Estensione	72°C	1 min		
Estensione finale	72°C	20 min		
Terminazione	4°C	2 min		

I prodotti di amplificazione sono stati, infine, fatti separare su gel d'agarosio 3 % e successivamente su capillare elettroforetico del tipo ABI-Prism 3100 presso il centro di sequenziamento di BMR Genomic al fine di analizzare i risultati utilizzando il *software* di visualizzazione elettroferogrammi *Peak scanner* versione 1.0.

RISULTATI

La steroido solfatasi è un enzima che catalizza la reazione di idrolisi del gruppo solfato su substrati steroidei normalmente inattivi e presenti in elevate concentrazioni nel circolo sanguigno e che possono quindi essere trasformati *in situ* in composti ormonalmente attivi. L'attività di questo enzima, oltre a rivestire una funzione fondamentale nei meccanismi di comunicazione cellulare, assume una grande importanza nell'ambito dei tumori ormono-dipendenti nei quali è stato rilevato un incremento dei suoi livelli di espressione rispetto alla controparte sana e dove rappresenta la via maggiormente utilizzata per la sintesi degli estrogeni promuoventi la proliferazione di tumori estrogeno-dipendenti.

Come già descritto precedentemente, stimolati dal fatto che nel nostro laboratorio, in relazione all'espressione tessuto specifica dell'enzima steroido solfatasi, nel tessuto adiposo erano stati evidenziati due diversi trascritti che differenziavano nella regione 5'-terminale non tradotta da quello placentare, (Dalla Valle *et al.*, 2005), ho deciso di approfondire questa linea di ricerca.

Inizialmente mi sono concentrata sulla ricerca di diverse varianti trascrizionali nei differenti tessuti che ci venivano forniti. In seguito, viste le implicazioni di questo enzima nell'ambito dei tumori ormono-dipendenti la ricerca è stata ampliata cercando di confrontare i diversi pattern di espressione sia in tessuti sani che nella loro controparte tumorale.

Questo confronto è risultato piuttosto difficile utilizzando le metodiche precedentemente utilizzate, (analisi 5-RACE) in quanto questi protocolli richiedono elevate quantità di RNA di partenza mentre i tessuti normalmente disponibili derivano sempre più da frammenti di biopsie dalle quali difficilmente si possono recuperare buoni quantitativi di RNA. Un chiaro esempio di questo è il caso della prostata, per la quale non si è mai avuto a disposizione materiale fresco. Per questo motivo ho scelto, in questo specifico caso, di esaminare l'espressione del gene STS in linee cellulari di carcinoma prostatico.

I tessuti umani utilizzati in questo lavoro sono stati ottenuti (tabella 1) grazie a diverse collaborazioni con il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Patologia Chirurgica, Università di Padova, il Dipartimento di Oncologia Chirurgica, CRO Aviano, la Chirurgia Generale 4° Clinica, Azienda Ospedaliera

Università di Padova, la Chirurgia Toracica Clinica, Azienda ospedaliera di Padova e dal Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Endocrinologia, Università di Padova.

Diversamente dalla 5'-RACE convenzionale, la tecnica RLM-RACE, che è stata adottata, permette di amplificare solo RNA messaggeri di lunghezza completa recanti il cappuccio in 5' e fornirci quindi indicazioni sicure sul sito di inizio della trascrizione e sugli eventuali processi di *splicing* alternativo.

Infine, allo scopo di effettuare uno studio non solo di tipo qualitativo ma anche di tipo quantitativo e quindi ricavare indicazioni circa il livello di utilizzo di ciascuna delle diverse varianti trascrizionali del gene STS nei differenti tessuti sia sani che tumorali, è stato scelto di provare ad applicare una recente tecnica: la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).

Questa tecnica non era mai stata precedentemente utilizzata nel nostro laboratorio e quindi ho eseguito una serie di prove iniziali per individuare le condizioni e i parametri migliori per il suo corretto utilizzo

I passaggi sperimentali seguiti nel lavoro condotto durante questo progetto di dottorato sono qui di seguito elencati:

- Estrazione dell'RNA totale, retrotrascrizione in cDNA e verifica che i tessuti in esame esprimano l'enzima STS.
- 5'-RLM-RACE dei tessuti risultati positivi alla verifica precedente.
- Sequenziamento dei trascritti isolati in modo diretto.
- Analisi delle probabili regioni promotrici localizzate a monte dei nuovi primi esoni caratterizzati per il rilevamento di possibili siti di legame con fattori di trascrizione
- Verifica e analisi delle varianti trascrizionali mediante MLPA.
- Normalizzazione e confronto dei risultati.

23. Estrazione dell'RNA totale e verifica dell'espressione del gene STS

Dopo l'estrazione dell'RNA totale dei campioni elencati nelle tabelle 1 e 2, 2 µg di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando *random* esameri. Il cDNA ottenuto è

stato quindi amplificato con oligonucleotidi specifici per la β -actina allo scopo di verificare la qualità dell'RNA di partenza.

Il trascritto dell'enzima STS, gene da me studiato, è stato invece amplificato con la coppia di oligonucleotidi STS-1 e STS-2, che riconosce una porzione della sequenza all'interno della regione codificante. In questo modo è stato possibile verificare non solo che il campione in esame esprimesse davvero tale messaggero, ma anche ottenere un'idea del suo livello di espressione. L'analisi 5'-RLM-RACE, infatti, richiede che la quantità di messaggero specifico non sia troppo bassa. In questo ultimo caso si rende necessaria una selezione dell'RNA poly (A)⁺ per aumentare la concentrazione dell'RNA specifico. Questo però non è quasi mai possibile dato le basse concentrazioni di RNA a nostra disposizione.

Con l'analisi dell'espressione della β -actina e della STS si è riscontrato un buon livello di espressione nella maggior parte dei campioni in possesso. Quelli che presentavano un basso livello di espressione non sono stati utilizzati nell'analisi di 5'-RLM-RACE per i motivi precedentemente descritti ma solo per l'analisi finale mediante MLPA.

Per questo motivo con l'analisi dell'STS si è dovuto eliminare, per esempio, il campione di cartilagine proveniente dalla testa del femore, l'utero sano e la linea di carcinoma prostatico LNCap. In questi casi infatti l'analisi RT-PCR ha evidenziato livelli di espressione per l'enzima STS troppo bassi.

24.5'-RLM-RACE dei trascritti di mRNA isolati

La regione 5'-terminale del messaggero codificante l'enzima STS è stata caratterizzata mediante 5'-RLM-RACE, eseguendo, dopo l'ultima fase di amplificazione del cDNA con decanucleotidi, due o tre PCR con oligonucleotidi specifici localizzati sull'esone 5 (STS-4), sull'esone 3 (STS-6) e sull'esone 2 (STS-10). Gli oligonucleotidi specifici sono stati accoppiati nella prima PCR con l'oligonucleotide adattatore esterno (5'-RACE *outer*) mentre nella seconda e nella terza con l'oligonucleotide adattatore interno (5'-RACE *inner*).

Il numero di reazioni di amplificazione necessarie dipende dal livello di trascrizione del gene nel singolo tessuto: in molti casi due PCR sono state

DISCUSSIONE

sufficienti, ma generalmente ne sono state eseguite tre per mettere in evidenza eventuali trascritti meno espressi.

Tutte le bande di amplificazione ottenute mediante RLM-RACE sono state estratte dal gel di agarosio e sequenziate direttamente presso il CRIBI. Solo in alcuni casi è stato necessario clonare il frammento di amplificazione ottenuto a causa di sequenze non perfettamente leggibili.

Nella figura 9 sottostante viene riportata la sequenza del cDNA dell'enzima STS ottenuta a partire dalla placenta (Stein *et al.*, 1989) con contrassegnati gli oligonucleotidi utilizzati per la determinazione dell'espressione dell'enzima e della regione 5'-UTR.

```

GCCTCCAGCAGCTGACGGGACCCAGCTGTAGTGAGGTTGCAGTGATTGAGTAGGATTGGCCTGCTTCAAAGCAGAGGTTT      80
CTCATGGGAATATGCTTATTAAGCTCCCCTGGTGCAGAAACCATGAACAGAGGATGAACAAGTGAAGTTGCAATCTCCT      160
CCATCACAGCTCAGTTCGCCAACCAACAGGATCACAAGCTGGAGATGCTTTAAGGAAGATGAAGATCCCTTTCCTCCTAG      240
STS-10
AGATCCCTTTCCTCCTAG
TGTTCTTTCTGTGGGAAGCCGAGAGCCACGCAGCATCAAGGCCGAACATCATCCTGGTGATGGCTGACGACCTCGGCATT      320
GGAGATCCTGGGTGCTATGGGAACAAAACATCAGGACTCCCAATATCGACCGGTTGGCCAGTGGGGAGTGAAACTCAG      400
STS-6
TCAGCACCTGGCAGCATCACCGCTGTGCACACCAAGCAGGGCAGCCTTCATGACTGGCCGGTACCCTGTCCGATCAGGAA      480
TGGCATCTTGGTCCCGCACTGGAGTTTTCCTCTTCACAGCCTCTTCGGGAGGACTTCCCACCGATGAGATTACCTTTGCT      560
AAGCTTCTGAAGGATCAAGGTTATTCAACAGCACTGATAGGAAATGGCACCTGGGATGAGCTGTACAGCAAGACTGA      640
STS-1
CTTCTGTCAACCCTTTACATCACGGCTTCAATTATTTCTATGGGATCTCTTTGACCAATCTGAGAGACTGCAAGCCCG      720
GAGAGGGCAGTGTCTTACCACGGGCTTCAAGAGGCTGGTCTTCTCCCTGCAGATCGTGGGGTACCCTCCTTACC      800
CTTGCTGCACTCAATTGTCTGGGGCTACTCCACGTGCCTCTAGGCGTTTTTTTTCAGCCTTCTCTTCTAGCAGCCCTAA      880
STS-4
CCTGACCCCTTTTCTTGGGCTTCTTCACTTCCCGCCCTGAACCTGCTTCATGATGAGGAACTACGAGATCATTCAGC      960
AGCCCCATGTCTATGACAACTCACCCAGAGGCTAACGGTGGAGGGCCAGTTTATACAGCGGAACACTGAGACTCCG      1040
TTCTGCTTGTCTTGTCTACCTCCACGTGCACACAGCCCTGTTCTCCAGCAAAGACTTTGCTGGCAAAAGTCAACACGG      1120
AGTCTACGGGGATGCTGTTGAGGAAATGGACTGGAGTGTGGGGCAGATCTTGAACCTTCTGGATGAGCTGAGATTGGCTA      1200
ATGAIACCCTCAICTACTTCACATCGGACCAGGGAGCACATGTAGAAGAAGTGTCTTCCAAAGGAGAAATTCATGGCGGA      1280
AGTAATGGGATCTATAAAGGAGGAAAAGCAAACAACCTGGGAAGGAGGTATCCGGGTTCCAGGCATCCTTCGTTGGCCAG      1360
GGTGATACAGGCTGGCCAGAAGATTGATAGCCCACTAGCAACATGGACATATTTCTACAGTAGCCAAGCTGGCTGGAG      1440
STS-2
CTCCCTTGCTGAGGACAGGATCATTGATGGACGTGATCTGATGCCCTGCTTGAAGGAAAAAGCCAACGCTCCGATCAT      1520
GAGTTTCTCTCCATTACTGCAACGCCTACTTAAATGTGTGCGCTGGCACCCCTCAGAACAGCACATCCATCTGGAAGGC      1600
CTTTTTCTTACCCCCAACTTCAACCCCGTGGGTTCCAACGGATGCTTTGCCACACACGTGTGCTTCTGTTTCGGGAGTT      1680
ATGTCACCCATCACGACCCACCTTACTCTTTGATATTTCAAAGATCCCAGAGAGAGAAAACCCACTAACTCCAGCATCC      1760
GAGCCCCGGTTTTATGAAATCCTCAAAGTCATGCAGGAAGCTGCGGACAGACACACCAGACCCCTGCCAGAGGTGCCGA      1840
TCAGTTTTCATGGAACAACCTTTCTTTGGAAGCCCTGGCTTCAGCTGTGCTGCTTCCACCGGCCTGTCTTGCCAGTGTG      1920
ATAGAGAAAAACAGGATAAGAGACTGAGCCGCTAGCAGCGCCTGGGGACCAGACAGACCGCATGTGGCAAAGTCACCATC      2000
TTCACTACAAAACAGCCTGAGAGTGGCACTGGGAAACATAACTCCATCTACACCTTGGATTGGACTGATTCCCCATT      2080
TATCACCTGAAGGCTTGGGCCAGAGCTCAACAGCTACTCAACTGGAGGGGTGAGGGGGATAAGGTCTGTAGTATACAGAC      2160
AGGAAGATGGTAGGTCTATGCCTTCTGTGGCCAGAGTCTTGGACTCATGGAAATAGAATGAATAGAGGGGCATTCAACAG      2240

```

Fig. 9. Sequenza del cDNA dell'enzima STS.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con la sequenza del DNA genomico umano corrispondente al gene STS e alla regione posta a monte dello stesso. Non avendo trovato in GenBank una sequenza di DNA genomico umano che contenesse un frammento sufficientemente lungo a monte del gene STS ho utilizzato due sequenze di DNA genomico inserite in vettori BAC e rilevate mediante analisi con il programma BLAST disponibile presso il sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Le due sequenze sono contenute nei cloni BAC RP11-483M24 (numero di accesso AC073583) e BAC GSHB-227L

(numero di accesso AC005704). Visto che il secondo clone BAC presenta la sequenza invertita, per ottenere la sequenza corretta abbiamo utilizzato il programma “Manipulate a DNA Sequence” disponibile presso il sito <http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit/manip/>. Infine le due sequenze sono state dopo sovrapposizione della zona centrale presente in entrambe. In questo modo si aveva a disposizione una sequenza contenente, oltre all'intero gene STS, anche un centinaio di kb a monte dello stesso. I risultati ottenuti hanno confermato non solo la presenza di trascritti analoghi a quelli già disponibili in rete e corrispondenti alla placenta ma anche l'utilizzo da parte di nuovi primi esoni (oltre ai due già messi in evidenza per la trascrizione del gene STS nel tessuto adiposo, Dalla Valle *et al.*, 2006) o nuovi meccanismi di *splicing* alternativo, sottolineando e confermando la complessità della regolazione dell'espressione di questo gene.

L'organizzazione strutturale della regione 5' del gene codificante per l'enzima STS viene riportata di seguito analizzando singolarmente le caratteristiche di ciascuna variante evidenziandone le differenze e le uguaglianze strutturali.

In generale si può dire che in molti dei tessuti analizzati l'enzima STS viene trascritto utilizzando più di una modalità di *splicing* alternativo. Spesso, infatti, ho ottenuto più di una banda di amplificazione, ognuna delle quali corrisponde ad un trascritto diverso. Solo un'analisi di tipo quantitativo può però dare delle indicazioni sull'uso preferenziale di ognuno di loro nei diversi tessuti.

In conclusione sono riuscita a determinare un totale di 8 nuovi esoni, oltre al primo esone già noto e corrispondente a quello placentare. Tutti gli introni del gene STS presentano tipici siti di *splicing* con GT al *donor* e AG all'*acceptor* ad eccezione però del primo introne successivo all'esone 0a, in quanto presenta la sequenza GC anziché GT nel sito 5'-*splice donor*.

25. Trascritto 1

Il **trascritto 1** (Fig. 10), corrisponde al trascritto placentare, presenta un primo esone di lunghezza massima pari a 216 b. Questo esone è stato chiamato **esone 1a** in quanto corrispondente a quello del trascritto riportato per primo in letteratura. L'esone 1a è separato dall'esone 2 dalla presenza di un introne di 33,5 kb con siti donatori ed accettori “GT” e “AG” in accordo con le sequenze consenso

canoniche (Shapiro e Senapathy, 1987). L'esone 1a è parzialmente tradotto nei primi tre amminoacidi della proteina codificata in quanto presenta un codone di inizio traduzione a partire dalle sue ultime 11 pb. L'esone 2 è comune a tutte le varianti trascrizionali individuate in questo studio e corrisponde all'esone a livello del quale è localizzato l'ultimo oligonucleotide specifico da noi utilizzato. Presenta una lunghezza di 141 b e contiene un sito alternativo di inizio della traduzione, in *frame* con quello presente nell'esone 1a, dopo 4 nt dall'inizio. La sequenza *consensus* di Kozak è parzialmente conservata mancando della G in posizione +4 (Kozak, 1986).

Le analisi condotte riportano l'individuazione di TSS multipli nell'esone 1a, tutti posizionati a monte del putativo codone di inizio ATG: uno a 205 nt, un altro a 142 nt e un altro ancora a 103 nt. Quest'ultimo, in realtà, è stato identificato nella sequenza del trascritto del colon e non di placenta. Inoltre tale trascritto è stato evidenziato anche nel tessuto polmonare sano dove presenta una lunghezza pari a 52 b.

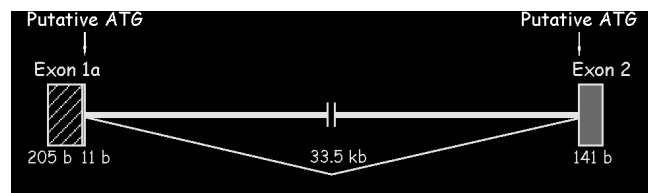


Fig. 10. Rappresentazione schematica del trascritto 1 contenente l'esone 1a. I riquadri indicano gli esoni: con parte colorata tradotta e parte a strisce non tradotta. Le linee gli introni. I numeri lungo la struttura corrispondono alle dimensioni di esoni ed introni. Le frecce verticali indicano i siti putativi di inizio traduzione.

26. Trascritto 2 e 3

I **trascritti 2 e 3** (Fig. 11), in precedenza erano stati dimostrati essere espressi nel tessuto adiposo sottocutaneo. Presentano un primo esone non tradotto, esone 0a e 0b rispettivamente, separati dall'esone in comune 1b di 129 b. L'**esone 0a**, viene utilizzato nella ghiandola mammaria, nel colon, nella corteccia surrenalica, nel fegato e nella papilla dermica del pelo, in un campione di ovario sano e nella linea DU145 e nell'epiglottide. Ognuno di questi tessuti utilizza siti di inizio della trascrizione (TSS) diversi, con una lunghezza massima dell'esone 0a corrispondente a 351 b. L'esone 0a è separato da un introne di 43,3 kb dal

secondo esone di 129 b (esone 1b) a livello del quale si trova un possibile codone di inizio della traduzione (dopo le prime 97 b). Il secondo esone è poi separato dal terzo, l'esone 2, da un introne di 62,19 kb.

L'**esone 0b**, presente nel trascritto 3, presenta una lunghezza massima di 143 nt ed è disgiunto dal secondo esone (esone 1b), in comune col trascritto 2, da un introne di 42,8 kb. Anche nel caso del trascritto 3, l'esone 1b fa splicing con l'esone 2 distanziato. Analogamente alla variante trascrizionale 2, l'esone 0b è espresso in numerosi tessuti quali ghiandola mammaria, fegato, pancreas, tiroide, utero, ovario tumorale, utero tumorale, timo tumorale, la linea cellulare DU145, l'epiglottide, il polmone e il timo tumorale. La mancanza di TATA box (vedi in seguito) porta alla sintesi di trascritti di lunghezza diversa a causa dell'utilizzo di diversi TSS. Ciò che invece differenzia il trascritto 3 da tutti gli altri è il fatto che sia l'unico a possedere un'isola CpG, posizionata 50 nt a monte dell'esone 0b e di lunghezza pari a 200 nt, e una sequenza *consensus* per il fattore trascrizionale Sp1 in corrispondenza dell'isola.

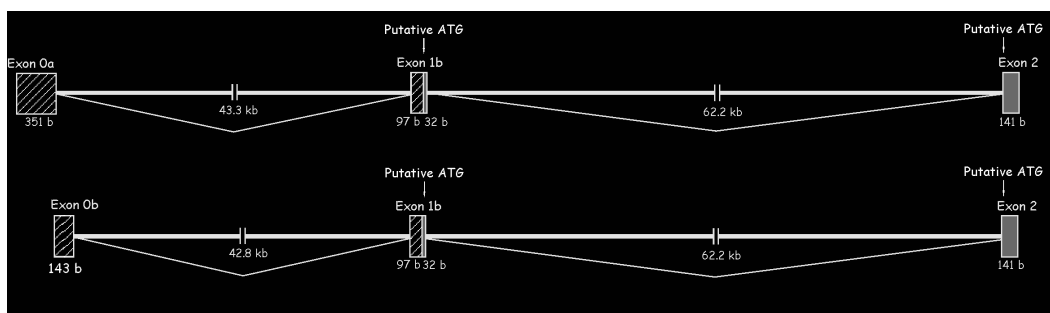


Fig. 11. Rappresentazione schematica dei trascritto 2 e 3 contenenti rispettivamente gli esoni 0a e 0b.

27. Trascritto 4

Il **trascritto 4** (Fig. 12) contiene un primo esone non tradotto, **esone 0c**, con lunghezza massima pari a 341 b. E' separato dall'esone 1b, lo stesso esone trovato anche nei trascritti 2 e 3, da un introne di 30,8 kb. La sua espressione è stata individuata a livello di ovario con un singolo sito di trascrizione e di papilla dermica con due siti di inizio trascrizione, uno in comune con ovario e l'altro localizzato 201 nt più a valle. Inoltre anche la linea cellulare di carcinoma prostatico PC 3 presenta questa variante in cui l'esone 0c ha lunghezza di 136 nt.



Fig. 12. Rappresentazione schematica del trascritto 4 contenente l'esone 0c.

28. Trascritto 5

Il **trascritto 5** (Fig. 13) contiene un primo esone non tradotto, **esone 1c**, con lunghezza massima di 153 b. Viene espresso in tiroide, linfomonociti e in un campione di ovario tumorale. L'esone 1c presenta una lunghezza diversa nelle tre diverse sedi, rispettivamente di 98 b, 89 b e 153 b. L'esone risulta separato dall'esone 2 da un introne di sole 854 b. L'esone 1c è privo di sito putativi di inizio della traduzione per cui è ipotizzabile che venga utilizzato l'ATG localizzato nell'esone 2.

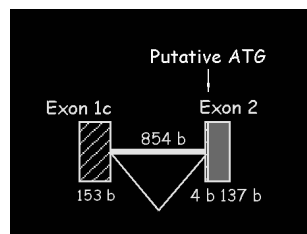


Fig. 13. Rappresentazione schematica del trascritto 5 contenente l'esone 1c

29. Trascritto 6

Il trascritto 6 (Fig. 14) è stato individuato in linfocociti e contiene un primo esone non tradotto esone 1d di 246 b, separato dall'esone 2 da un introne di 477 b. Similmente al trascritto 5, essendo privo di siti di inizio traduzione, la proteina risulta tradotta a partire dall'ATG localizzato nell'esone 2.

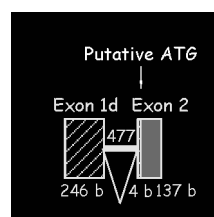


Fig. 14. Rappresentazione schematica del trascritto 6 contenente l'esone 1d

30. Trascritto 7

Il **trascritto 7** (Fig. 15) è stato individuato in un campione di ovario tumorale ma nel caso di questa paziente non ho potuto analizzare la controparte sana in quanto il tumore coinvolgeva l'intero organo. L'analisi condotta su questo campione ha permesso di rilevare due diverse forme di trascritto per l'enzima STS, una corrispondente alla variante numero 5 (esone 1c), mentre l'altra completamente nuova, il trascritto 7.

Il nuovo trascritto individuato corrisponde in realtà ad una nuova modalità di *splicing* alternativo e presenta un primo esone non tradotto **0b** di 42 b seguito da un introne di 11,816 kb con siti di *splicing* canonici GT e AG che lo separa da un altro esone non tradotto **0c**. In questo caso l'esone 0c si estende per 156 b e viene collegato all'esone **1b** e infine all'esone **2**.

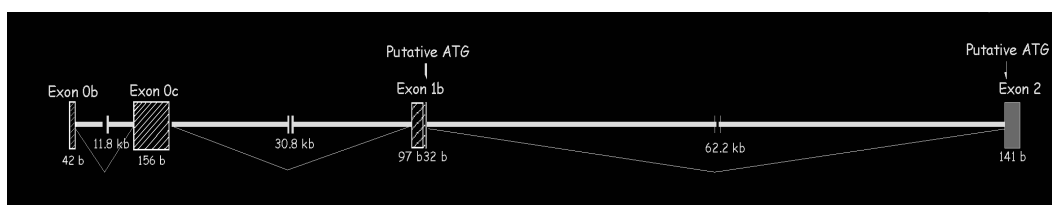


Fig. 15. Rappresentazione schematica del trascritto 7 contenente la nuova modalità di *splicing*

31. Trascritto 8

Il **trascritto 8** (Fig. 16) è stato identificato solo nella linea cellulare di carcinoma prostatico, PC-3, nella quale avevo trovato un'altra variante trascrizionale già nota (trascritto 4).

Il trascritto 8 presenta un primo **esone 0d** di 17 b, separato dall'**esone 1e** di 73 b dalla presenza di un introne di 4,8 kb con siti di *splicing* canonici GT e AG. L'esone 1e viene separato dall'esone 2 da un introne di 56,4 kb con siti canonici di *splicing* GT e AG.

La regione in cui si situa l'esone 0d è molto vicina all'esone 1b (solo 875 b a valle). L'analisi delle sequenze degli esoni presenti in questo trascritto porta all'ipotesi che sia l'esone 0d che l'esone 1e siano codificanti: le ultime 7 basi dell'esone 0d contengono un ATG in frame con l'esone 1e e l'esone 2.

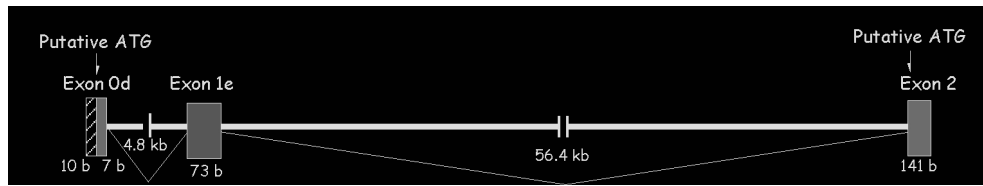


Fig. 16. Rappresentazione schematica del trascritto 8 contenente l'esone 0d

La sequenza attorno all'ATG non rispecchia esattamente la sequenza consenso prevista nel controllo dell'inizio della traduzione (Kozak, 1986) in quanto manca della base purinica in posizione -3 ; mantiene una G in posizione $+4$.

32. Analisi preliminare delle regioni promotrici

Per completare l'analisi di questi trascritti ho pensato di analizzare le regioni di controllo della trascrizione poste a monte dei vari primi esoni alternativi appena descritti. Pertanto ho considerato una regione di 300 pb a monte di ogni primo esone con lo scopo di verificare sia la presenza di sequenze iniziatrici che determinano il sito di inizio della trascrizione (TATA box, iniziatori e isole CpG), che la presenza di eventuali sequenze consenso per fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione dell'espressione genica. Le sequenze prese in esame sono state analizzate con i seguenti programmi disponibili in rete: "GrailEXP" (<http://compbio.ornl.gov/Grail-1.3/>) per la determinazione delle isole CpG; "Hctata" (http://125.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html) per l'analisi del TATA box; "Motif search" (<http://motif.genome.jp/>) e "TFsearch" (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) per la messa in evidenza di sequenze consenso per fattori trascrizionali. Con gli ultimi due programmi è stata utilizzata una soglia di identità pari al 95%.

Come già descritto nell'introduzione la regione promotrice a monte dell'esone 1a risulta essere inusuale in quanto manca del TATA box, non possiede isole ricche in GC e risulta difettiva anche di regioni di ancoraggio per il fattore Sp1 e per altri fattori di trascrizione noti (Li *et al.*, 1996). Come spesso succede per geni privi di TATA box, possiede invece più siti di inizio della trascrizione. Le analisi non solo hanno confermato questo risultato ma hanno anche messo in evidenza come nessuno dei promotori prossimali associati ai diversi trascritti qui descritti contenga sequenze TATA box.

Questo risultato spiega i molteplici TSS, utilizzati dai vari tessuti e trovati a livello di ogni primo esone. Fa eccezione l'esone 1d che contiene solo il TSS utilizzato dai linfomonociti, ma questo solo perché la sua espressione è stata messa in evidenza in un solo tessuto mediante l'analisi 5-RLM-RACE.

I geni privi di TATA box e di sito iniziatore spesso fanno parte dei geni "housekeeping" e presentano, in una regione che spesso non dista più di cento pb dal sito di inizio, una sequenza nucleotidica di 20-50 coppie di basi ricca in GC, riconosciuta dal fattore di trascrizione Sp1 (Biologia molecolare della cellula, Lodish *et al.* 2002,). Le isole CpG, se non metilate e poste subito a monte di un promotore di un gene svolgono una funzione necessaria, ma non sufficiente per la trascrizione, e sono un'indicazione del fatto che un gene è potenzialmente attivo. Tutti i geni "housekeeping" espressi in modo costitutivo, hanno isole CpG, mentre soltanto una minoranza dei geni regolati in modo tessuto specifico le possiede.

L'analisi delle isole CpG ha messo in evidenza la presenza di un'isola CpG 50 nt a monte dell'esone 0b con una lunghezza pari a circa 200 nt, lunghezza quindi superiore a quella normalmente attesa. Tutti gli altri promotori non presentano isole CpG e quindi questo gene si differenzia dagli altri geni privi di TATA box e facenti parte del gruppo degli house-keeping gene.

L'analisi preliminare successivamente effettuata per i fattori della trascrizione non ha messo in evidenza nessuna sequenza consenso per i fattori che ci si aspettava di trovare come l'SF-1 (sito di legame per il fattore 1 della steroidogenesi), o elementi di risposta agli ormoni steroidei quali ERE (elemento di risposta degli estrogeni), o PRE (elemento di risposta al progesterone), ARE (elemento di risposta agli androgeni) o GRE (elemento di risposta ai glucocorticoidi).

A livello della zona del promotore prossimale a monte dell'esone 0d è stata invece messa in evidenza la presenza di sequenze riconosciute dal fattore Sp1 e dal fattore Ets (*E26 transformation-specific transcription factors*) che è stato riconosciuto come un regolatore chiave nella tumorigenesi delle ghiandole endocrine (Gutierrez-Hartmann *et al.*, 2007).

Tipo	Posizione	Filamento	Sequenza	Probabilità
Sp1	801 - 813	-	agctcctcccct	0,96
Ets	677 - 687	+	cgcaggaagtg	0,91
Ets	555 - 565	+	tgcaggaagag	0,81
Sp1	782 - 794	-	ggtcctccctgc	0,79
Sp1	640 - 652	+	tggaggtggggtc	0,71
Ets	627 - 637	-	ctctcccct	0,66
Ets	854 - 864	+	tgcaggaagag	0,64
Sp1	484 - 496	-	ggtcctcctctc	0,58

Tab. 7. Analisi delle sequenze amminoacidiche codificate dai diversi trascritti.

33. Confronto tra tessuti sani e tumorali.

Andando ad analizzare i risultati dell'analisi di 5'-RLM-RACE è possibile effettuare un primo ma sicuramente molto limitato confronto tra quei campioni per i quali era disponibile sia il tessuto sano che la controparte tumorale.

Da tale confronto emerge come nei campioni tumorali il primo esone non tradotto maggiormente utilizzato risulti essere l'esone 0b.

Tessuto	Patologia	Esone utilizzato
Ovario-1	Tumorale	0b
Ovario-2	Sano	0a
	Tumorale	0b
Utero	Sano	/
	Tumorale	0b
Polmone	Sano	1a
	Tumorale	0b
Timo	Tumorale	0b
DU145	Linea tumorale	0a-0b
PC3	Linea tumorale	1e

Tab. 8. Confronto tra primi esoni non tradotti utilizzati in tessuti sani e tumorali

L'uso dell'esone 0b anziché di quello 0a a livello tumorale potrebbe essere associato al fatto che il trascritto contenente tale primo esone è l'unico tra quelli conosciuti a possedere nella regione promotrice un'isola CpG e un sito di legame per il fattore trascrizionale Sp1 che lo rendono un promotore probabilmente più forte degli altri. D'altra parte però nella linea DU-145 di carcinoma prostatico è stato verificato l'uso di entrambi gli esoni 0a e 0b. Questo sottolinea l'importanza di un'analisi di tipo quantitativo per identificare quale dei due sia quello maggiormente espresso.

34. Regione N-terminale della proteina STS tradotta a partire da trascritti diversi

Come precedentemente descritto, nei nuovi esoni da me determinati sono presenti codoni putativi di inizio della traduzione (esoni 1a, 1b 0d e 2). Le eventuali proteine tradotte a partire da tali codoni potrebbero quindi presentare regioni N-terminali di lunghezza diversa.

Nello specifico, la proteina risultante dalla traduzione a partire dall'esone 1b (presente nei trascritti contenenti gli esoni 0a, 0b, 0c) presenta 7 aminoacidi aggiuntivi rispetto alla proteina tradotta a partire dall'esone 1a (esone presente nella trascrizione dell'STS a livello della placenta). Oltre a questi aminoacidi aggiuntivi i primi 4 aminoacidi della placenta sono diversi dagli aminoacidi 8-11 derivanti dall'esone 1b. Nel caso degli esoni 1c e 1d, privi di codoni di inizio putativi, la traduzione deve partire dal codone presente nell'esone 2 e quindi la proteina risulta 5 aminoacidi più corta.

La traduzione a partire dall'esone parzialmente codificante 0d porta invece ad un'ipotetica proteina con 23 aminoacidi in più rispetto alla proteina tradotta nella placenta.



Fig. 17. Porzione N-terminale delle proteine eventualmente codificate dai diversi trascritti. Le frecce indicano la posizione dell'introne tra gli esoni 1a e 2, tra gli esoni 1b e 2 e gli esoni 0d, 1e e 2. I triangoli indicano il potenziale sito di clivaggio del peptide segnale.

Queste diverse lunghezze non dovrebbero influire sull'attività catalitica dell'enzima perché la prima parte della proteina, in tutti e 4 i casi illustrati nella figura 9, dovrebbe venir eliminata, in quanto costituisce il peptide segnale per consentire il trasporto attraverso la membrana del reticolo endoplasmatico.

Tale peptide è costituito da una regione N-terminale basica, una regione centrale idrofobica e una regione C-terminale maggiormente polare (Von Heijne, 1986).

L'analisi mediante il programma <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> ha infatti messo in evidenza come tutte e 4 le proteine contengano con elevata probabilità un peptide segnale e che il sito di taglio si localizza tra gli aminoacidi SHA e AS.

Nella figura precedente vengono indicate con un triangolo nero le posizioni possibili per il sito di taglio operato dalla peptidasi mentre le frecce indicano la separazione tra gli esoni.

Un'ipotesi alternativa è che in realtà la traduzione della proteina abbia sempre inizio a partire dall'esone 2 portando in tutti e 4 i casi alla sintesi della stessa proteina.

35. Messa a punto della metodica MLPA per l'analisi delle varianti trascrizionali del gene STS

Mediante la metodica MLPA i campioni sono stati quindi sottoposti ad una analisi inizialmente di tipo qualitativo e con l'avanzare dell'esperienza anche di tipo quantitativo. Non avendo mai utilizzato prima d'ora questa tecnica, ho eseguito una serie di prove per individuare le condizioni e i parametri maggiormente adeguati ad ottenere dati più precisi. In letteratura, la MLPA viene descritta come una metodica specifica, sensibile, riproducibile, semplice e veloce. E' stato in

base a queste caratteristiche, confermate in ogni lavoro pubblicato, che si è scelto di provare ad utilizzarla in alternativa alla Real time PCR per eseguire una analisi del tipo e dei livelli di espressione delle diverse forme trascrizionali del gene STS. Dell'intero procedimento ciò che risulta di fondamentale importanza è la scelta delle sequenze di ibridazione delle sonde (*probe*). Nel sito della MRC-Holland (<http://www.mrc-holland.com/>) è possibile trovare una guida molto precisa e dettagliata per chi desidera disegnare le proprie sonde. Nei kit messi in commercio la lunghezza delle sonde viene ottenuta grazie all'aggiunta di sequenze *stuffer* e questo permette di ottenere anche sonde relativamente lunghe (fino a 490 nt); quando invece le sonde vengono sintetizzate chimicamente vengono consigliate lunghezze che vanno da un minimo di 96 nt ad un massimo di 140 nt come lunghezza totale della *probe* (LPO + RPO). La T_m delle sequenze ibridizzanti deve avere un valore minimo di 67,5°C. Nell'analisi di RT-MLPA le due sonde devono essere disegnate in modo tale da ibridizzare in prossimità delle regioni terminali di due esoni così da evitare l'amplificazione di contaminazioni di DNA genomico. E' stato scelto di localizzare il confine tra i due esoni nella sonda LPO in modo da poter utilizzare una singola sonda RPO (che è anche la più costosa in quanto fosforilata) con differenti sonde LPO ciascuna specifica per una diversa forma trascrizionale. Nello specifico ho scelto di accoppiare RPO-ex1b (ex sta per esone) con le semi-*probe* LPO per gli esoni 0 (0a, 0b e 0c); RPO-ex2 con le LPO per gli esoni 1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1e) e RPO-ex5 con LPO-ex4 per una porzione della regione codificante comune a tutti i trascritti (tabella 10). Inoltre deve essere tenuta in considerazione la presenza di SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) che devono essere preferibilmente evitati o, qualora non fosse possibile, devono essere posizionati in punti ben precisi delle sonde in modo da non interferire con la successiva reazione di ligazione. Molte altre sono le indicazioni di cui tener conto nel disegnare questi oligo, indicazioni che vengono dettagliatamente riportate nel protocollo messo a disposizione dalla MRC-Holland.

Un elemento di cui si è dovuto tener conto è che il gene STS è pseudoautosomico, sfugge all'inattivazione del cromosoma X, e possiede nel cromosoma Y uno pseudogene che risulta trascrizionalmente inattivo a causa della delezione del promotore e/o di alcuni esoni, e dalla presenza di numerosi codoni di stop e larghe

inserzioni nucleotidiche. Anche se trascrizionalmente inattivo si è cercato di evitare di disegnare le sonde in regioni presenti anche nel pseudogene del cromosoma Y; dove non possibile, come per la sonda localizzata nell'esone 2, la sonda è stata disegnata in modo che la regione di ligazione si localizzasse in corrispondenza di differenze presenti tra la sequenza del cromosoma X e quella del cromosoma Y.

35.1. Prima prova: verifica delle lunghezze degli amplificati

Come prima prova ho verificato che le lunghezze degli amplificati ottenuti con la reazione di PCR fossero effettivamente quelle attese dalle dimensioni delle *sonde* utilizzate (tabella 10). Il protocollo della MLPA è stato quindi eseguito utilizzando però singole coppie specifiche di *semi-probe*, anziché una *probe mix*, e usando come stampo un campione che esprimesse quel determinato esone.

Dai dati ottenuti è risultato che le dimensioni sono diverse da quelle attese; in particolare tutti gli amplificati si presentano con circa 2-3 nucleotidi più corti del previsto. Secondo la ditta MCR-Holland a cui sono stati chiesti chiarimenti, tale situazione è essere del tutto normale in quanto, questa eventualità succede anche con le sonde da loro preparate e contenenti le sequenze *stuffer*. Tale effetto potrebbe essere dovuto ad un'interferenza del fluorescente usato per marcare il *primer forward* della PCR sulla corsa elettroforetica capillare come anche riportato da Stern e collaboratori (Stern *et al.*, 2004).

Un unico problema è emerso con la sonda per l'esone 1e: anche utilizzando il campione di cDNA della linee cellulare PC-3, nella quale era stata messa in evidenza la presenza di questo trascritto, non ho ottenuto nessun amplificato. Questo potrebbe essere spiegato sia con problemi specifici della sonda o con un troppo basso livello di espressione del trascritto corrispondente a questo esone.

La sensibilità di questa tecnica potrebbe essere inferiore alla sensibilità della normale PCR, non solo perché viene condotta per soli 35 cicli ma anche perché tutte le *sonde* vengono amplificate con la stessa coppia di *primer* arrivando velocemente al consumo dei *primer* stessi. Questo però permette di poter analizzare e confrontare tra di loro le altezze relative dei picchi e di ottenere anche dei dati quantitativi. La ditta a questo scopo consiglia di usare sempre almeno 5 o più coppie di *probe*, proprio per ottenere un adeguato consumo dei *primer*.

RPO	LPO	Esone indagato	Lunghezza attesa (nt)	Lunghezza ottenuta (nt)
RPO-ex1b	LPO-ex0a	0a	120	118
	LPO-ex0b	0b	124	122
	LPO-ex0c	0c	128	126
RPO-ex2	LPO-ex1a	1a	96	93
	LPO-ex1b	1b	100	97
	LPO-ex1c	1c	104	101
	LPO-ex1d	1d	107	104
	LPO-ex1e	1e	116	-
RPO-ex5	LPO-ex4	cod	112	110

Tab. 9. Lunghezze attese e ottenute degli amplificati per ciascuna coppia di semi-*probe*.

I picchi che sono stati ottenuti non risultano ben definiti ma presentano a destra un secondo e più basso picco. Questo potrebbe derivare dal fatto che abbiamo fatto purificare in PAGE solo l'oligonucleotide RPO fosforilato e non quello LPO. Sonde lunghe come quelle utilizzate in questa tecnica spesso presentano una piccola percentuale di sintesi non ottimale e questo potrebbe aver determinato la presenza dei picchi secondari, che sono però più bassi del picco principale. Per questo motivo si ha in programma la purificazione anche delle sonde LPO in PAGE.

35.2. Seconda prova: confronto tra retrotrascrizione con *random* esanucleotidi e con *primer* specifici

Dopo aver individuato i valori corrispondenti a ciascun trascritto analizzato, ho proseguito con la messa a punto della metodica utilizzando una *mix* quasi completa delle *probe* (priva delle sonde per gli esoni 0 e per l'esone 1e). Il cDNA da utilizzare nella reazione di RT-MLPA può derivare sia da una retrotrascrizione con esanucleotidi, come quella da me utilizzata per verificare la qualità dell'RNA e l'espressione del gene STS nei vari campioni, che da una retrotrascrizione eseguita con oligonucleotidi specifici. Quest'ultimo tipo di cDNA viene in effetti consigliato dalla MCR-Holland e in questa prova ho voluto confrontare i risultati ottenuti con i due diversi cDNA. I *primer* RT specifici utilizzati sono stati in un

primo tempo quelli siglati STS-14 e STS-16 ed in seguito è stato aggiunto il primer STS-1bR.

STS-14 e STS-16 sono entrambi posizionati subito a valle delle sonde RPO utilizzate nelle reazioni di MLPA (sonde RPO-ex2 e RPO-ex4), e sono stati usati alla concentrazione 40 nM (valore consigliato dai pochi articoli disponibili circa la RT-MLPA); mentre STS-1bR è posizionato subito a valle della emisonda RPO-ex1b, e quindi localizzato nell'esone 1b.

L'esigenza di introdurre un altro primer specifico nella reazione di retrotrascrizione è nata nel momento in cui ci si è accorti che la somma dell'altezza dei picchi per gli esoni 0 (0a, 0b, 0c) non corrispondeva all'altezza del picco dell'esone 1b, quando invece tale esone è contenuto in tutti i trascritti che partono dagli esoni 0.

Molto probabilmente questa discrepanza derivava proprio dal fatto che la mix di retrotrascrizione mancava di un *primer* specifico posizionato subito a valle della emisonda RPO-ex1b (e quindi sull'esone 1b), ma aveva solamente un *primer* localizzato nell'esone 2 e quindi relativamente lontano, diminuendo di conseguenza l'efficienza della reazione di retro-trascrizione.

Confrontando le analisi effettuate precedentemente con i risultati dell'analisi condotte aggiungendo alla miscela di primer specifici anche questo nuovo primer si è notato un aumento del segnale per gli esoni 0a, 0b e 0c, con una corrispondenza abbastanza precisa tra i picchi degli esoni 0 e quello per l'esone 1b.

In generale comunque dall'analisi dei dati eseguita mediante *Peak scanner* ho potuto notare come l'altezza dei picchi, corrispondenti ognuno ad uno specifico amplificato, fosse più alta nel caso di cDNA ottenuto con *primer* RT-specifici.

Campione	RT <i>random</i>		RT specifica	
	Esone	Altezza	Esone	Altezza
Utero T	1b	3391	1b	6224
	1c	83	1c	670
	cod	3121	cod	6102

Tab. 10. Confronto tra RT con *random* esameri e primer specifici. T: tumorale; cod: regione codificante.

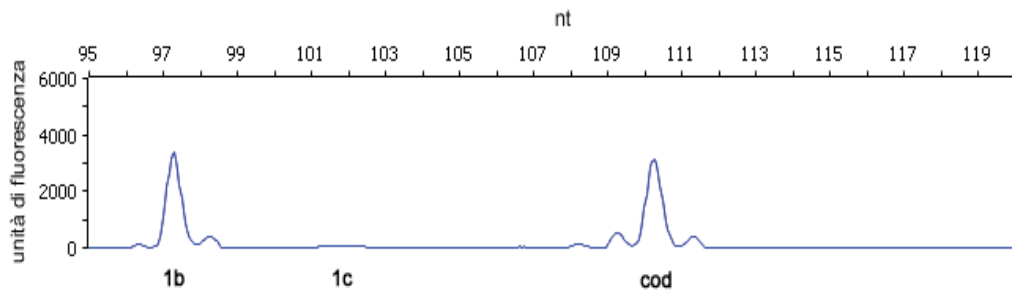


Fig. 18. Elettroferogramma di utero tumorale con RT con *random* esameri.

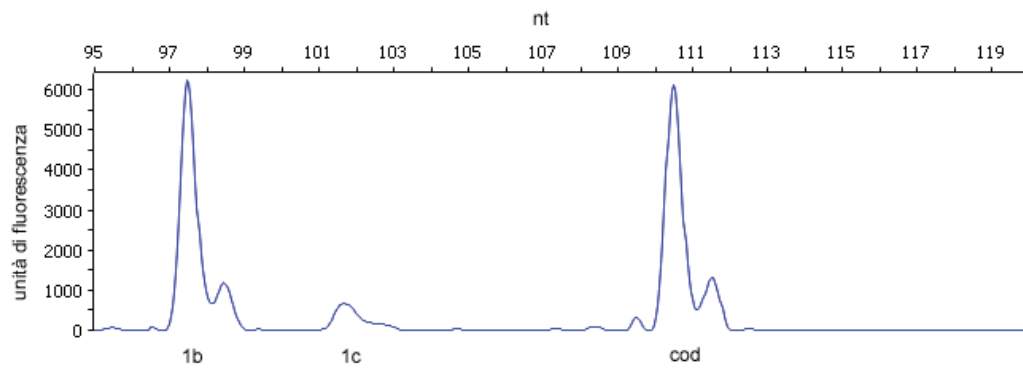


Fig. 19. Elettroferogramma di utero tumorale con RT specifica.

Per verificare questo risultato ho anche condotto delle amplificazioni con oligonucleotidi specifici utilizzando il cDNA ottenuto sia dalla retrotrascrizione con esanucleotidi che dalla retrotrascrizione con *primer* specifici.

Come si può vedere dalla figura 20 che illustra la PCR condotta a 35 cicli con i *primer* STS-0b e STS-6, in grado di mettere in evidenza la presenza del trascritto contenente il primo esone 0b, ho ottenuto un amplificato più intenso con il cDNA proveniente dalla retrotrascrizione con oligonucleotidi specifici. Questo cDNA è stato quindi utilizzato in tutte le nuove reazioni di MLPA.

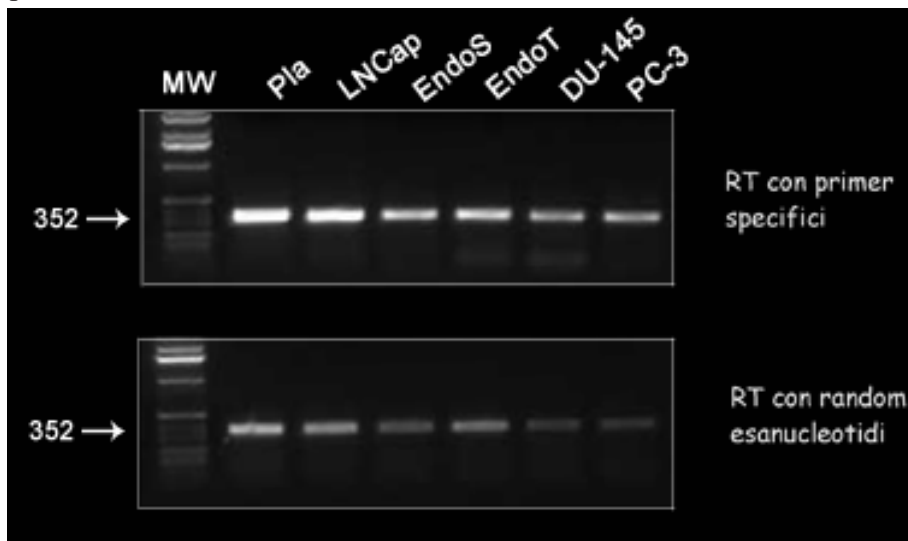


Fig. 20. Gel di agarosio delle PCR con *primer* STS-0b e STS-6 delle reazioni RT con *primer* specifici STS-14 e STS-16 (sopra) e con *random* esanucleotidi (sotto). MW: scala di DNA; Pla: placenta; EndoS: utero sano; EndoT: utero tumorale.

35.3. Terza prova: DQ control

In questa prova ho analizzato gli stessi campioni della prova numero due aggiungendo alla *probe mix* i “DQ control”. I frammenti DQ sono 4 frammenti di controllo di 64, 70, 76 e 82 nt che permettono di avere indicazioni sulla quantità corretta di cDNA aggiunto. Le dimensioni del loro picco sono infatti inversamente correlate con la quantità di cDNA del campione. Sono quindi da scartare le analisi nelle quali tali picchi siano decisamente evidenti e non solo accennati. Questi 4 frammenti non richiedono la reazione di ligazione per essere amplificati e quindi non costituiscono un controllo per questa reazione. Nel nostro caso i frammenti di controllo sono stati individuati con fatica, nei campione analizzati, ad eccezione del campione DU-145, più avanti descritto (vedi figura 23); negli altri campioni l’altezza dei picchi è sempre molto bassa indicando quindi un adeguato quantitativo di cDNA utilizzato per ciascun campione, pari a 200 ng. Nel campione DU-145 i 4 picchi sono tutti evidenti, anche se molto più bassi dei picchi derivanti dal campione stesso e questo potrebbe indicare che in realtà abbiamo caricato meno campione del previsto. Secondo il protocollo della MCR-Holland sono comunque da scartare le reazioni MLPA nelle quali l’altezza dei picchi di controllo raggiunga il 50% dell’altezza delle amplificazioni attese. La lunghezza dei frammenti di controllo è risultata con una dimensione diversa da quella attesa analogamente a quanto avviene per i frammenti delle *probe* amplificate. I valori ottenuti sono indicati in tabella 12.

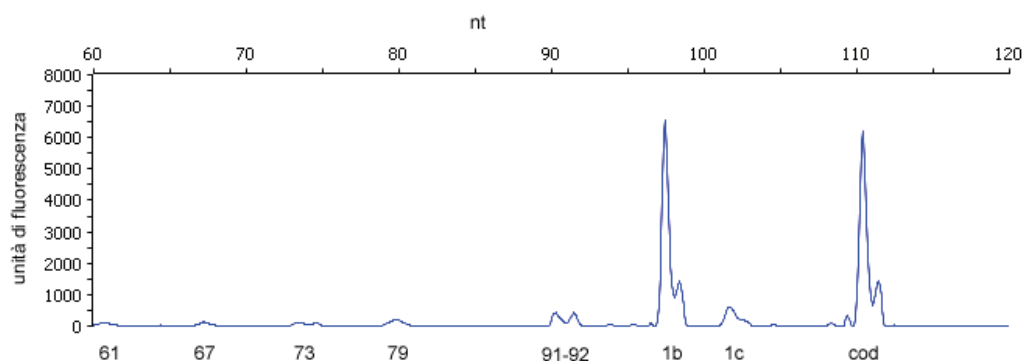


Fig. 21. Elettroferogramma di utero tumorale con DQ control.

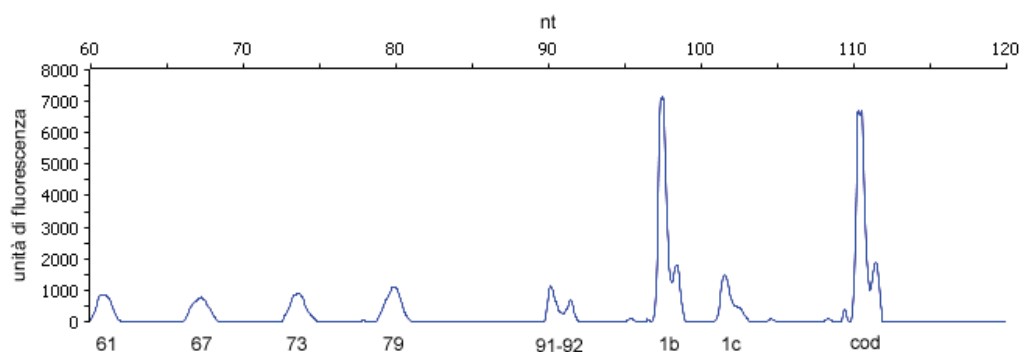


Fig. 22. Elettroferogramma di DU-145 con DQ *control*.

DQ <i>control</i> attesi e ottenuti
64 → 61
70 → 67
76 → 73

Tab. 11. Valori (nt) attesi e ottenuti dei DQ *control*.

Il DQ *control mix* contiene anche un quinto prodotto di amplificazione di 92 pb generato da una sonda MLPA che consiste di due oligonucleotidi sintetici che complementano sulla sequenza di DNA genomico 2q14. Il picco generato da questa *probe* dovrebbe avere, nell'analisi con DNA genomico, un'altezza paragonabile a quella delle altre sonde e permette di verificare non solo se la quantità di DNA aggiunto è giusta ma anche se la reazione di ligazione è stata condotta correttamente. Nei nostri campioni questo picco non dovrebbe essere presente in quanto le nostre analisi sono condotte su cDNA; questo picco in realtà è risultato visibile in alcuni campioni da noi analizzati ma sottoforma di due picchi separati, uno di 91 e uno di 92 pb. Uno dei due picchi potrebbe essere un prodotto aspecifico, già evidenziato in altri campioni privi di DQ-*control*, mentre il secondo picco probabilmente risulta da una lieve contaminazione con DNA genomico. Questa eventuale contaminazione da DNA genomico non può comunque interferire con l'analisi in quanto le *probe* per l'MLPA sono state tutte selezionate a cavallo di un introne.

36. Analisi finale dei campioni

A questo punto, una volta trovate quelle che sono sembrate le condizioni ottimali per la reazione di MLPA, si è proceduto con l'analisi di tutti i campioni stoccati nel tempo.

Dato l'elevato numero di diversi tessuti analizzati, trovare un gene housekeeping che potesse rappresentare bene tutti i tessuti è stato piuttosto difficile.

Consigliati anche dallo staff della MCR-Holland si è scelto di utilizzare come gene housekeeping di riferimento il gene codificante per la β -2 microglobulina (B2M). In effetti lo scopo preliminare era quello non tanto di avere una quantificazione assoluta dei trascritti, ma piuttosto delineare un quadro generale dei pattern di trascrizione di ciascuna tessuto.

I dati ottenuti dopo reazione di MLPA sono stati normalizzati dividendo l'area di ogni picco di ciascun trascritto per l'area dei picchi corrispondenti per il gene B2M. A seguito di ciò i dati ottenuti dai diversi tessuti sono stati confrontati tra di loro.

Dalle prime prove effettuate con il gene housekeeping ci si è resi conto di come questo gene fosse altamente espresso in tutti i tessuti, e di come la sua abbondanza avrebbe impegnato tutti i primer della reazione a discapito delle probe corrispondenti agli altri trascritti portando ad un abbassamento del segnale corrispondente alla trascrizione del gene STS. Si quindi deciso di ridurre la concentrazione della semiprobe coinvolgente il gene B2M al valore di 1/400.

I risultati di questa analisi sono riportati in tabella 13.

Analizzando nello specifico questi risultati si nota che l'esone 1a è espresso nel tessuto placentare con livelli davvero elevati, come del resto era atteso sulla base dei dati della letteratura e delle nostre precedenti analisi. L'espressione dell'esone 1a è stata riscontrata anche nel tessuto polmonare sia sano che tumorale, confermando così i risultati della 5'-RACE. Bassi livelli di espressione si notano inoltre anche a livello di altri tessuti.

L'esone 1c, precedentemente rilevato in tiroide e linfomonociti risulta essere espresso, seppur con bassi valori di espressione, in tutti tessuti analizzati ad eccezione del campione di cartilagine artrosica della testa del femore.

Come si può vedere l'esone 1d e in particolare l'esone 1e sono espressi sempre a bassi livelli in un numero limitato di campioni.

Per quanto riguarda l'esone 1b si riscontra la sua presenza in tutti i tessuti analizzati con valori di espressione che vanno dal 9 al 52% rispetto all'esone 1b placentare e dal 4.6 al 26% rispetto all'espressione dell'esone 1a, sempre a livello della placenta

Benché gli esoni 0a, 0b, 0c siano sempre correlati all'esone 1b, si è deciso di analizzare anche i loro specifici pattern di espressione dal momento che vengono guidati da differenti promotori. Il più alto livello di espressione si è riscontrato per l'esone 0b, mentre il più basso per lo 0c.

Per il tessuto placentare si è visto che i trascritti contenenti l'esone 1b sono associati maggiormente all'esone 0a, piuttosto che all'esone 0b, come per altro riscontrato in molti altri tessuti.

Da un punto di vista quantitativo due problemi sono emersi analizzando i risultati ottenuti dalla reazione di MLPA.

Primo: la somma dei risultati ottenuti per i trascritti 0a, 0b e 0c (nonostante la presenza del primer STS-1bR nella retrotrascrizione) risulta sempre minore rispetto al valore ottenuto per il trascritto 1b, eccetto nel caso della placenta dove i valori risultano simili. Questa incongruenza potrebbe essere spiegata dal fatto che forse l'efficienza di annealing della emi-probe per questo trascritto è migliore rispetto alle altre oppure dalla presenza di primi esoni non ancora scoperti e che sono associati a questo trascritto.

Allo stesso modo il valore associato alla regione codificante risulta essere generalmente inferiore rispetto alla somma dei valori che corrispondono agli esoni 1a, 1b, 1c, 1d e 1e. Questi risultati suggeriscono che il set di sonde per la regione codificante abbia un'efficienza inferiore rispetto ai set per gli esoni 1. Solo in quattro campioni i risultati ottenuti sono stati simili o in 2 casi con un livello superiore di trascritti per la regione codificante. In questi casi è ipotizzabile la presenza di trascritti alternativi non ancora determinati.

E' comunque importante ricordare che la presenza di uno pseudogene per l'STS a livello del cromosoma Y ha condizionato e limitato la scelta dei primers che avrebbero composto il set delle nostre semi probe.

Tissues	SEX		Exon	Exon	Exon	Exon	Exon	Cod.	Exon	Exon	Exon
			1a	1b	1c	1d	1e	reg.	0a	0b	0c
Adrenal gland *	C	F	N/D	1.99	0.04	N/D	N/D	1.37	0.08	0.69	0.01
Colon-1 #	C	F	0.02	2.12	0.06	0.01	0.01	1.48	0.30	0.55	0.01
Colon-2 #	C	M	0.03	2.68	0.08	0.02	N/D	1.97	0.35	0.57	0.01
Dermal papilla- 1 *	N	F	0.01	3.06	0.06	0.04	N/D	2.37	0.32	0.49	0.36
Dermal papilla- 2 #	N	M	0.02	2.27	0.03	0.02	N/D	1.65	0.31	0.43	0.21
DU-145 *		M	N/D	1.29	0.16	0.01	0.01	1.27	0.08	0.95	0.01
Femoral head	N	F	0.03	0.54	0.02	0.08	N/D	0.45	0.06	0.24	N/D
Cartilage #	A	F	N/D	2.16	N/D	N/D	0.02	2.56	0.41	0.84	N/D
LnCap #		M	N/D	1.61	0.30	0.03	N/D	1.50	0.07	0.99	N/D
Lung *	N	M	0.42	1.10	0.19	N/D	N/D	1.48	0.09	0.65	0.01
	C	M	0.14	1.44	0.11	0.01	0.01	1.43	0.20	0.82	N/D
Mammary gland *	C	F	N/D	2.56	0.03	0.03	N/D	1.74	0.02	0.81	0.01
Ovary-1 *	C	F	N/D	1.18	0.07	N/D	N/D	1.14	0.01	0.64	N/D
Ovary-2 *	N	F	N/D	2.37	0.10	0.02	0.01	1.67	0.74	0.52	0.01
	C	F	N/D	1.20	0.24	0.09	N/D	1.48	0.04	1.13	N/D
Ovary-3 *	C	F	0.01	0.99	0.03	N/D	N/D	0.85	0.01	0.58	N/D
Ovary-4 *	C	F	0.04	0.83	0.05	0.02	N/D	0.83	0.01	0.44	N/D
Pancreas *	C	M	N/D	1.39	0.02	N/D	N/D	1.07	0.02	0.56	0.01
Placenta *	N	F	11.82	5.91	0.68	N/D	N/D	14.17	5.97	0.25	N/D
PC3 *		M	N/D	1.66	0.09	0.01	0.01	1.15	0.38	0.18	0.33
Skin-1 #	N	F	N/D	2.14	0.09	N/D	N/D	1.49	0.03	0.72	0.25
Skin-2 #	N	F	N/D	1.45	0.07	0.02	N/D	1.22	0.12	0.44	0.20
Thymus #	N	F	N/D	1.00	0.06	0.01	N/D	0.75	0.06	0.47	N/D
	C	F	N/D	1.69	N/D	0.01	N/D	0.54	0.06	1.41	N/D
Uterus-1 (N)#,(C)*	N	F	N/D	1.39	0.10	N/D	N/D	0.99	0.34	0.45	0.01
	C	F	N/D	1.27	0.08	0.01	N/D	1.38	0.24	0.56	0.01
Uterus-2 *	C	F	N/D	1.08	0.01	N/D	N/D	0.63	0.01	0.37	N/D
Uterus-3 *	C	F	N/D	1.58	0.02	N/D	N/D	0.97	0.01	0.49	N/D

Tab. 12. Tessuti o cellule usate per l'analisi MLPA. * = Campioni sottoposti sia a 5'-RACE che MLPA. # = Campioni sottoposti solo a RT-MLPA, dati I bassi livelli di espressione di STS o alle basse concentrazioni di RNA. N tessuti normali; C = tessuti tumorali; A= Cartilagine artrosica della testa del femore. N/D = not detected

37. Analisi mediante RT-PCR.

Per confermare i risultati ottenuti mediante 5'-RTM-RACE e mediante l'analisi di RT-MLPA, sono state una serie di reazioni di PCR con coppie di primer specifici per i diversi esoni in esame, utilizzando il cDNA ottenuto da RT specifiche.

L'analisi è stata condotta sul cDNA preparato a partire dalla maggior parte dei campioni in nostro possesso. Di seguito verranno riportate le immagini delle reazioni condotte solo su alcuni dei campioni presi in esame quali PC-3, LNCap, utero sano e tumorale e placenta.

Si è scelto di utilizzare uno stesso oligo antisenso (STS-6) da accoppiare con i primer senso specifici per ciascun esone dal quale prendono il nome: STS-0a; STS-0b; STS-0c; STS-1a; STS-1c; STS-1d; STS-1e. La regione codificante è stata invece amplificata con la coppia STS-1 e STS-2.

L'esone 1b non è stato esaminato complessivamente ma attraverso l'analisi degli esoni 0a, 0b e 0c visto che tutti e tre fanno splicing su questo.

Le reazioni di PCR sono state allestite con un numero di cicli pari a 35, uguale a quello utilizzato in seguito nella reazione di amplificazione dei prodotti di ligazione della MLPA, in modo tale da avere anche un confronto quantitativo e non solo qualitativo.

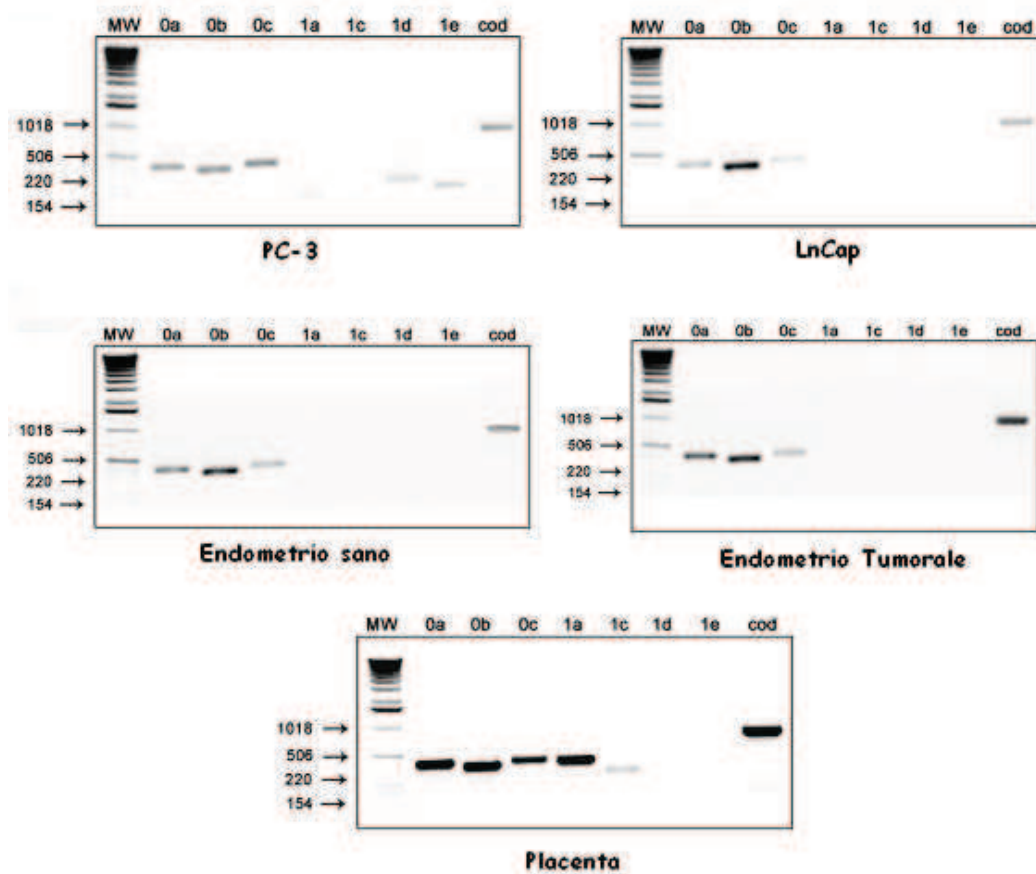


Fig. 23. Gel di agarosio delle RT-PCR per i campioni PC-3, Lncap, Utero sano e tumorale e placenta. Le dimensioni dei frammenti sono: esone 0a, 391 pb; esone 0b, 352pb; esone 0c, 392; esone 1a, 386 pb; esone 1c, 259 pb; esone 1d, 327 pb; esone 1e, 194 pb; regione codificante cod, 772 pb. MW: scala di DNA..

Come si può notare il campione di placenta è quello che possiede in generale l'intensità di bande maggiore per quasi tutti gli esoni esaminati, questo a conferma del fatto che la placenta è la fonte principale dell'espressione dell'enzima STS. La presenza e l'alta intensità dell'amplificazione per l'esone 1a, rilevata sia mediante MLPA che con RT-PCR, conferma quanto era stato identificato precedentemente mediante RLM-RACE. Anche gli esoni 0a, 0b e 0c risultano molto intensi ma questo deriva dal fatto che i 35 cicli della PCR, visti i livelli di espressione di questo gene nella placenta, non rientrano più nel range di linearità della reazione di amplificazione. I risultati ottenuti con l'analisi MLPA sono sicuramente più affidabili da un punto di vista quantitativo perché le varie amplificazioni avvengono con un unico set di oligo che viene quindi consumato prima di uscire dalla zona di linearità. Analogamente a quanto successo con l'analisi MLPA non abbiamo ottenuto amplificazioni per gli esoni 1d ed 1e.

Nel caso della linea cellulare PC3 notiamo la presenza seppur con bassi livelli di intensità degli esoni 1d ed 1e, e livelli leggermente più elevati dei tre esoni 0a, 0b e 0c. Questo ultimo risultato è in accordo con quanto ottenuto dall'analisi MLPA mentre non erano stati rilevati dalla metodica di 5'-RACE. Quest'ultima tecnica comunque non sempre è in grado di evidenziare tutti i trascritti presenti, soprattutto se il livello di espressione non è elevato, come nel caso di questa linea cellulare.

Per la linea cellulare LnCap, che non era stata analizzata mediante RLM-RACE, dato che l'intensità del trascritto corrispondente alla regione codificante era stata giudicata troppo bassa, si sono ottenute bande corrispondenti a tutti gli esoni 0 anche se l'esone 0c non verrà in seguito visualizzato in MLPA.

Per quanto riguarda il tessuto endometriale (campione 1 nella tabella dell'MLPA), mediante 5'-RLM-RACE avevo analizzato solo la controparte tumorale in quanto i livelli di RNA estratto dal tessuto sano non erano sufficienti per eseguire la metodica. Dalle RT-PCR e dall'analisi MLPA, entrambe concordanti, emerge che i due tessuti esprimono gli stessi esoni, con livelli di espressione simili.

I risultati dell'analisi RT-PCR confermano quindi i risultati ottenuti mediante MLPA, non solo da un punto di vista qualitativo ma anche quantitativo. Le eventuali piccole differenze sono sicuramente imputabili a trascritti presenti in concentrazione estremamente basse.

DISCUSSIONE

In questi ultimi anni la steroido solfatasi è stata oggetto di numerosi studi per l'implicazione che la sua attività può avere sia a livello della comunicazione cellulare che dello sviluppo di tumori ormono-dipendenti. E' stato infatti dimostrato come agli alti livelli di espressione del messaggero dell'STS in tessuti tumorali sia associata una cattiva prognosi per il tumore alla mammella in donne in pre- e post-menopausa.

Analoghe considerazioni possono essere fatte anche per i tumori che colpiscono il tratto riproduttivo femminile come nel tumore maligno dell'utero (Yamamoto *et al.*, 1993), o nel carcinoma dell'ovario e della vagina (Milewich e Porter, 1987). Nel tumore alla prostata, l'idrolisi del gruppo solfato del DHEA-S rende disponibili elevate concentrazioni di DHEA per la sintesi di androgeni maggiormente dotati di attività ormonale e soprattutto implicati nella promozione della crescita tumorale, quali il 5α -diidrotestosterone (Selcer *et al.*, 2002).

Inoltre, il fatto che non tutti i tessuti esprimono la steroido solfatasi esprimano anche l'aromatasi potrebbe spiegare perchè l'inibizione dell'attività della STS risulti più efficace da un punto di vista terapeutico rispetto al blocco dell'aromatasi (Reed *et al.*, 2005).

Partendo da questo presupposto, risultava di grande interesse lo studio delle modalità di trascrizione di tale enzima a livello non solo della placenta ma anche degli altri tessuti od organi di espressione.

L'analisi da che ho condotto ha messo in luce come l'espressione di tale gene sia probabilmente tessuto regolata analogamente a quanto succede per l'enzima P450arom che catalizza la sintesi degli estrogeni a partire dagli androgeni. Inoltre la sua espressione viene modificata, nei tessuti tumorali, mediante l'utilizzo di primi esoni alternativi non tradotti, spesso associati a promotori più forti.

La tecnica usata per mettere in luce i processi di splicing alternativo è stata la 5'-RLM-RACE. L'analisi ha evidenziato che la regolazione dell'espressione di questo gene si attua mediante l'uso di promotori alternativi. In particolare, sono riuscita a determinare la presenza di 8 varianti trascrizionali, un numero che ben sottolinea la complessità della regolazione della trascrizione di questo gene.

Nello specifico, oltre all'esone 1a già riportato in letteratura abbiamo trovato altri 6 differenti primi esoni e una variante trascrizionale che utilizza due esoni non codificanti in successione. Mentre gli esoni 0a, 0b e 0c, associati tutti all'esone 1b, e gli esoni 1c e 1d, non sono codificanti gli esoni 1a, 1b, 0d ed 1e sono parzialmente codificanti in quanto presentano un ATG in *frame* con l'esone 2. Questo potrebbe portare alla traduzione di proteine con regione N-terminale diversa, senza però modificare le capacità catalitiche dell'enzima stesso, visto che la regione terminale costituisce comunque un peptide segnale che viene eliminato nella proteina matura.

Per quanto riguarda la sede di espressione dei vari trascritti, possiamo notare come gli esoni 0a e 0b siano quelli che vengono riscontrati nel maggior numero di tessuti analizzati, mentre per quanto riguarda gli altri esoni la loro espressione si attua in un numero piuttosto limitato di tessuti.

Un fatto molto interessante, che dovrà comunque essere confermato da ulteriori analisi, è l'utilizzo prevalente dell'esone 0b come primo esone non tradotto nei tessuti tumorali. L'uso di questo esone anziché di quello 0a potrebbe essere associato al fatto che il trascritto contenente tale primo esone è l'unico tra quelli conosciuti che deriva da una regione promotrice dotata di un'isola CpG e di un sito di legame per il fattore trascrizionale Sp1; tutto questo lo rende probabilmente un promotore più forte degli altri. Questa ipotesi verrà in un secondo momento verificata mediante analisi sul promotore stesso.

Nella linea DU-145 di carcinoma prostatico abbiamo verificato l'uso di entrambi gli esoni 0a e 0b, come era stato evidenziato per il tessuto di mammella. Questa evidenza potrebbe non essere casuale dal momento che studi recenti condotti sui meccanismi di sviluppo del tumore mammario e di quello prostatico, hanno fatto ipotizzare un comune modello di regolazione da parte degli estrogeni e degli androgeni (Friedman, 2007). Ciò che è stato verificato è un'associazione tra alti livelli di E2 e un aumento dell'attività telomerasica col risultato di rendere le cellule "immortalizzate".

L'analisi del promotore prossimale condotta su tutti i trascritti ha messo in evidenza la mancanza del TATA box. Di conseguenza, l'inizio della trascrizione è risultato erratico con numerosi TSS.

Ottenuto questo quadro generale (e probabilmente completo, visto il grande numero di tessuti o organi diversi analizzati) dei diversi meccanismi di splicing alternativo operanti nella trascrizione del gene STS risultava importante poter analizzare le varianti trascrizionali di singoli tessuti, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, in modo rapido e possibilmente anche economico. Per questo mi sono indirizzata verso l'applicazione di una nuova metodologia che si pone, nel caso dell'analisi di espressione, in un certo senso come una possibile alternativa alla Real Time PCR. Quali sono i vantaggi di questa tecnica rispetto alla precedente? Innanzitutto c'è la possibilità di analizzare un campione singolo e di studiarne tutte le possibili alternative di trascrizione con una singola reazione di PCR ed una singola corsa elettroforetica. L'analisi estemporanea di un singolo campione potrebbe risultare estremamente costosa nel caso della Real Time PCR in quanto ogni singolo trascritto richiede una sua curva di taratura e quindi il numero di provette e di reazioni aumenta enormemente (attualmente sarebbe necessario analizzare 8 varianti diverse oltre alla regione codificante e al gene house-keeping per la normalizzazione dei dati).

La tecnica, secondo i dati in letteratura, è sia riproducibile che sensibile e non richiede grossi investimenti in termine di dotazione di laboratorio; le analisi elettroforetiche finali infatti possono essere anche condotte da servizi di sequenziamento esterni.

I risultati ottenuti con questa tecnica sono stati confrontati con quelli derivanti dalle analisi di 5'-RACE e di RT-PCR. Questo confronto ha dimostrato come tale approccio di MLPA scelto possa essere utilizzato per ottenere velocemente un quadro abbastanza preciso delle modalità di trascrizione del gene STS in un determinato tessuto. Questo approccio potrà essere utilizzato per analizzare un numero consistente di campioni di tessuto sano e tumorale, partendo anche da quantità di RNA estremamente basse. Questo tipo di analisi ci potrebbe permettere in futuro di verificare la possibilità che la trasformazione tumorale comporti l'uso di primi esoni alternativi associati magari a promotori più forti.

Durante lo svolgimento di questo progetto è stato pubblicato anche un articolo (Zaichuk *et al.*, 2007) i cui dati confermano una parte dei risultati da noi ottenuti. In questo lavoro è stata eseguita una singola analisi di 5'-RACE su una linea cellulare di tumore mammario umano, analisi che ha portato alla determinazione

di quattro trascritti diversi corrispondenti agli esoni 1a, 0b, 1b e 1c. In seguito a questa determinazione sono state allestite dei protocolli di Real Time PCR per la determinazione di tali trascritti in tessuti umani diversi. I risultati ottenuti dalla Real Time PCR confermano, per quanto riguarda l'esone 1a, i suoi alti livelli di espressione in sede placentare. Zaichuk e collaboratori hanno inoltre mostrato come i più alti livelli di espressione per il gene STS vengano evidenziati a livello del tessuto cerebrale, dove l'attività dell'STS è essenziale nella sintesi di steroidi neuroattivi. L'esone maggiormente utilizzato in questa sede risulta essere l'esone 1b. Questo esone viene riscontrato in molti altri tessuti quali cuore, fegato, ovaio, tessuto adiposo, analogamente alle mie indagini di MLPA dove la presenza dell'esone 1b si riscontra in tutti i tessuti analizzati, con valori di espressione variabili ma sempre elevati rispetto agli altri primi esoni. La loro analisi non distingue tra i trascritti derivanti da 0a, 0b e 0c, che risultato comunque associati a promotori diversi. Anche l'esone 1c viene studiato e riscontrato, come nel mio caso, in buona parte dei tessuti analizzati ma con valori di espressione molto bassi.

Il dato più interessante di questo articolo è però costituito dall'analisi di tutta una serie di campioni di tumore alla mammella. Con questa analisi gli autori hanno dimostrato che i tumori mammari positivi per la forma alfa del recettore degli estrogeni (ER α positivi) presentano livelli significativamente più elevati di espressione dell'enzima STS rispetto ai tumori ER α negativi. L'esone 1b mostra livelli di espressione elevati nei tessuti normali dove risulta essere l'isoforma maggiormente utilizzata. Invece, nei tessuti tumorali ER α positivi si nota un aumento dell'espressione dell'esone 1a. L'espressione dell'esone 1a potrebbe anticipare lo sviluppo tumorale e quindi meriterebbe di essere studiato come marker di rischio per i tumori ER α positivi rispetto a quelli ER α negativo. Gli autori ipotizzano che l'espressione di questo trascritto alternativo, derivante da un promotore più forte, potrebbe portare ad un aumento di sintesi di estrogeni e favorire la progressione tumorale. Gli autori dimostrano anche che la trascrizione del gene STS viene regolata mediante il legame di ER α a regioni ERE poste sul promotore distale associato sia all'esone 1a che 1b.

Tutto ciò indica che la regolazione differenziale dell'enzima STS gioca effettivamente un ruolo fondamentale nella regolazione sia autocrina che paracrina riguardante la crescita cellulare tumorale.

Alla luce di quanto riportato, risulta evidente che la ricerca sui diversi meccanismi di regolazione della trascrizione tessuto-specifica del gene STS rimane ancora aperta e richiede che tutti i tessuti che esprimono questo enzima, o perlomeno quelli che possono sviluppare forme di tumore ormone dipendente, vengano analizzati per verificare l'eventuale presenza di altri primi esoni tessuto specifici, ed inoltre che, nell'indagine quantitativa, vengano prese in esame tutte le varianti presenti.

Il passo successivo sarà invece quello di attuare un'analisi sulla funzionalità dei diversi promotori e sui fattori di trascrizione coinvolti nell'espressione di questo gene.

BIBLIOGRAFIA

- Ballabio A., Shapiro L.J.. *Steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis*. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (Eds.), *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 2999-3022 (1995).
- Bedin M., Weil D., Fournier T., Cedard L., Frezal J., *Biochemical evidence for the non inactivation of the steroid sulfatase locus in human placenta and fibroblasts*. *Human Genetics* 59: 256-258 (1981).
- Bunyan D.J., Eccles D.M., Sillibourne J., Wilkins E., Simon Thomas N., Shea-Simonds J., Duncan P.J., Curtis C.E., Robinson D.O., Harvey J.F. and Cross N.C.P., *Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification*, *British Journal of Cancer* 91: 1155-1159 (2004).
- Choe B.K., Lillehoj H.S., Dong M.K., Gleason S., Barron M., Rose N.R., *Characterization of antigenic sites of human prostatic acid phosphatase*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 390: 16-26. (1982).
- Coughtrie Michael W.H., Sharp S., Maxwell K., Innes N.P., *Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases*, *Chemico-Biological Interactions* 109: 3–27 (1998).
- Dalla Valle L., Toffolo V., Nardi A., Fiore C., Bernante P., Di Liddo R., Parnigotto PP. and Colombo L., *Tissue-specific transcriptional initiation and activity of steroid sulfatase complementing dehydroepiandrosterone sulfate uptake and intracrine steroid activations in human adipose tissue*, *Journal of Endocrinology* 190: 129–139 (2006).
- Dalla Valle L., Toffolo V., Nardi A., Fiore C., Armanini D., Belvedere P., Colombo L., *The expression of the human steroid sulfatase-encoding gene is driven by alternative first exons*, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 107: 22-29 (2007).
- Dillo Waljit S., Murphy K.G., Bloom S., *Endocrinology: the next 60 years*, *Journal of Endocrinology* 190: 7–10 (2006).
- Epstein E.H., Leventhal M.E., *Steroid sulfatase of human leukocytes and epidermis and the diagnosis of recessive X-linked ichthyosis*. *Journal of the Clinical Investigation* 67: 1257-1262 (1981).

BIBLIOGRAFIA

- Ferrante P., Messali S., Meroni G., Ballabio A.. *Molecular and biochemical characterisation of a novel sulphatase gene: aryl sulphatase G (ARSG)*. European Journal of Human Genetics 10: 813-818. (2002)
- Friedman Edward *Can a single model explain both breast cancer and prostate cancer?*, Theoretical Biology and Medical Modelling 4:28 (2007).
- Garabed Eknayan, *Emergence of the Concept of Endocrine Function and Endocrinology*, Advances in Chronic Kidney Disease 11(4): 371-376 (2004).
- Ghosh Debashis, *Mutations in X-linked ichthyosis disrupt the active site structure of estrone/DHEA sulfatase*, Biochimica et Biophysica Acta 1739: 1–4 (2004).
- Gutierrez-Hartmann A., Duval D.L., Bradford A.P., *ETS transcription factors in endocrine Systems*, Trends Endocrinology Metabolism 18 (4): (2007).
- Hernandez-Martín A., Gonzà Lez-Sarmiento R. and De Unamuno P., *X-linked ichthyosis: an update*, British Journal of Dermatology 141: 617–627 (1999).
- Hernandez-Guzman F.G., Higashiyama T., Osawa Y., Ghosh D., *Purification, characterization and crystallization of human placental estrone/dehydroepiandrosterone sulfatase, a membrane-bound enzyme of the endoplasmic reticulum*, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 78: 441–450 (2001).
- Hernandez-Guzman F.G., Higashiyama T., Pangborn W., Osawa Y., Ghosh D., *Structure of Human Estrone Sulfatase Suggests Functional Roles of Membrane Association*, The Journal of Biological Chemistry 278(25): 22989–22997 (2003).
- Hoffmann R., Rot A., Niiyama S., Billich A., *Steroid sulfatase in the human hair follicle concentrates in the derma papilla*. Journal of Investigative dermatology 117: 1342-1348 (2001)
- Howarth N.M., Purohit A., Reed M.J., Potter B.V., *Estrone sulfamatepotent inhibitors of estrone sulfatase with therapeutic potential*. Journal of Medicinal Chemistry 37: 219-221 (1994)
- Kozak M.. *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. Cell, 44, 283-292 (1986)
- Lekanne Deprez R. H., Fijnvandraat Arnoud C., Ruijter J.M., and Moorman Antoon F.M., *Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase*

- chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions*, Analytical Biochemistry 307: 63–69 (2002).
- Li X.M., Alperin E.S., Salido E., Gong Y., Yen P., Shapiro L.J., *Characterization of the promoter region of human steroid sulfatase: a gene which escapes X inactivation*, Somatic Cell Molecular Genetics 22: 105-117 (1996).
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E.. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli editore (2002).
- Miki Y., Nakata T., Suzuki T., Darnel A.D., Moriya T., Kaneko C., Hidaka K., Shiotsu Y., Kusaka H., Sasano H., *Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotrasferase in human adult and fetal tissues*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87: 5760-5768. (2002)
- Migeon B., Shapiro L.J., Norum R.A., Mohandas T., Axelman J., Dabora R.L., *Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosome*. Nature 299: 838-840. (1982)
- Milewich L., Porter J.C., *In situ steroid sulfatase activity in human epithelial carcinoma cells of vaginal, ovarian and endometrial origin*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 65, 164-169 (1987).
- Nakamura Y., Miki Y., Suzuki T., Nakata T., Darnel D.A., Moriya T., Tazawa C., Saito H., Ishibashi T., Takahashi S., Yamada S., and Sasano H., *Steroid Sulfatase and Estrogen Sulfotransferase in the Atherosclerotic Human Aorta*, American Journal of Pathology 163(4): (2003).
- Nakata T., Takashima S., Shiotsu Y., Murakata C., Ishida H., Akinaga S., Li P., Sasano H., Suzuki T., Saeki T., *Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients*, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 86: 455–460 (2003).
- Okuda T., Saito H., Sekizawa A., Shimizu Y., Akamatsu T., Kushima M., Yanaihara T., Okai T., Farina A., *Steroid Sulfatase Expression in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma: Immunohistochemical Study*, Gynecologic Oncology 82: 427–434 (2001).
- Parker C.R.J., Falany C.N., Stockard C.R., Stankovic A.K., Grizzle W.E. *Immunohistochemical localization of dehydroepiandrosterone sulfotransferase in human fetal tissues*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 78: 234-236. (1994).

BIBLIOGRAFIA

- Reed M. J., Purohit A., Woo L.W., Newman S.P., Potter B.V., *Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation, and Inhibition*, *Endocrine Reviews* 26(2):171–202 (2005).
- Salido E. C., Yen, P. H., Barajas, L., and Shapiro, L. J. *Steroid sulfatase expression in human placenta: immunocytochemistry and in situ hybridization study*, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 70(6):1564-7 (1990).
- Sardiello M., Annunziata I., Roma G. and Ballabio A., *Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship*, *Human Molecular Genetics* 14(21) (2005).
- Schouten J.P., McElgunn Cathal J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*, *Nucleic Acids Research* 30 (12 e57) (2002).
- Selcer K.W., Kabler H., Sarap J., Xiao Z., Li P.K., *Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCaP human prostate cancer cells*, *Steroids* 67 (10):821-6. (2002)
- Shapiro L.J., Mohandas T., Weiss R., Romeo G., *Non-inactivation of an X-chromosome locus in man*, *Science* 204: 1224-1226. (1979)
- Shapiro M.B., e Senapathy P. *RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and implications in gene expression*. *Nucleic Acids Reserch.*, 15, 7155-7174 (1987).
- Stein C., Hille A., Seidel J., Rijnbout S., Waheed A., Schmidt B., Geuze H., Von Figura K., *Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 13865-13872 (1989).
- Stern Rowena F., Roland G. Roberts, Kathy Mann, Shu C. Yau, Jonathan Berg and Caroline Mackie Ogilvie, *Multiplex ligation-dependent probe amplification using a completely synthetic probe set*, *BioTechniques* 37:399-405 (2004).
- Sugawara Teruo and Fujimoto Seiichiro, *The potential function of steroid sulphatase activity in steroid production and steroidogenic acute regulatory protein expression*, *Biochemical. Journal.* 380: 153–160 (2004).
- Sugawara T., Nomura E. and Hoshi N., *Both N-terminal and C-terminal regions of steroid sulfatase are important for enzyme activity*, *Journal of Endocrinology* 188: 365–374 (2006).

- Suzuki T., Nakata T., Miki Y., Kaneko C., Moriya T., Ishida T., Akinaga S., Hirakawa H., Kimura M., Sasano H., *Estrogen Sulfotransferase and Steroid Sulfatase in Human Breast Carcinoma*, *Cancer Research* 63: 2762–2770 (2003).
- Suzuki M., Ishida H., Shiotsu Y., Nakata T., Akinaga S., Takashima S., Utsumi T., Saeki T., Harada N., *Expression level of enzymes related to in situ estrogen synthesis and clinicopathological parameters in breast cancer patients*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (2008) Epub ahead of print
- Ugele B. and Regemann K., *Differential increase of steroid sulfatase activity in XX and XY trophoblast cells from human term placenta with syncytia formation in vitro*, *Cytogenetics and Cell Genetics* 90:40–46 (2000).
- Utsunomiya H., Ito K., Suzuki T., Kitamura T., Kaneko C., Nakata T., Niikura H., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H., *Steroid Sulfatase and Estrogen Sulfotransferase in Human Endometrial Carcinoma*, *Clinical Cancer Research* 10: 5850–5856 (2004).
- Von Heijne G. *A new method for predicting signal sequence cleavage sites*. *Nucleic Acids Research* 14, 4683-4690 (1986).
- Williams M.L., Elias P.M.. *Stratum corneum lipids in disorders of cornification*, *Journal of the Clinical Investigation* 68: 1404-1410 (1981).
- Yamamoto T., Kitawaki J., Urabe M., Honjo H., Tamra T., Noguchi T., Okada H., Sasaki H., Tada A., Terashima Y., Nakamura J., Yoshihama M. *Estrogen productivity of endometrium and endometrial cancer tissue; influence of aromatase on proliferation of endometrial cancer cells*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*., 44, 463-468 (1993).
- Yanaihara A., Otsuka Y., Iwasaki S., Okai T., Yanaihara T., *Strong expression of steroid sulfatase in human cumulus cells in patients with uterosis*, *Fertility and Sterility* 84(2) (2005).
- Yen P.H., Marsh B., Allen E., Tsai S.P., Ellison J., Connoly L., Neiswanger K., Shapiro L.J.. *The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y encoded pseudogene: evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution*. *Cell* 55: 1123-1135. (1988)
- You X., Yang R., Tang X., Gao L., Ni X., *Corticotropin-Releasing Hormone Stimulates Estrogen Biosynthesis in Cultured Human Placental Trophoblasts*, *Biology of Reproduction* 74: 1067–1072 (2006).

BIBLIOGRAFIA

Zaichuk T., Ivancic D., Scholtens D., Schiller C., Seema A.K., *Tissue-specific transcripts of human steroid sulfatase are under control of estrogen signaling pathways in breast carcinoma*, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 105: 76–84 (2007).

APPENDICE

Esone 0a = 351 b lunghezza massima

Ma-1 Ovs1 Co-1
 ↓TTCTACATTTACAAGTAGCCAC↓AGGTGATGTCCCGGT↓GCTGGTCACCCTAGGCAGCCAGGCCACTTG
 DU145
 ACGGACCTTCTGTGCCTCT↓ACACTGTTGACGGCGGGGATAAATTCCTTATGGTTGCATAGGGCACTCCTGTG
 Adr-Cor
 CACTGCGGGAAGTTTAAACAGTATCACTGGTCTGGACTCCACT↓AGATGCCAGTGACCCCATCACTCCTCGCCA
 Co-2 Li Dp Ad-1
 GCTGTG↓ACAGCC↓AAAATGTCTCCTGACATCGCCAT↓TGC↓CAGATGCCCTCAGGGCTGCAAAACCGCCAGG
 TAGAGAACCGCTACCATGCAGGATGCTACCATCAAAGTGCGCCACAGCAGCAACCTTGGAGCAGGCAG**GCAA**
GTATCCTCCAG

Esone 0b = 143 b lunghezza massima

DU 145
 Endo Ovt1 Ad-t2
 ↓TGC↓ATGAACACTGCCCCGCCGCGGCCCCAGGCCGTGACGTACCCCGCGCCGACCGTCCCCACGCC↓CACA
 Ty-t2
 Ut-T1
 Pa-t1 Ovt2 Ma-t2 Ut-t2 Li-t2 Ty-t3
 CAAGACCGCCCTT↓ACTGGAGGCGGGCGCTGC↓ACACT↓ACCC↓ACCC↓AGAAGA↓AGTCCGTCCATGTCAAA
 GATGAG**CAAGTATCCTCCAG**

Esone 0c = 341 b lunghezza massima

Ov-t1
 Dp-t2
 ↓CTCCAAAGTGATGAGTTGGTGAAGGAAGTCCAGCTTCCCTCTGAGTGATGTTAAAAATGTGTGGGGCACTGG
 GGGAGAGGAAGGCCAGGTGGAGAAATACATGCAGTTAAATAACTTTTTTATGATAGATTGCTGATTACT
 Ovt2 Dp-t2 PC
 AGTGATGACTTTATTGCCAATGATGCTCCAATATAACTGCCCA↓GCTGTCAAATGATT↓ATTC↓ACACACGAT
 GAGCGTTCCGGCTGGGATACTTGTCCAATGTGATGGTATGAAAAGCTGTTTGAGATCCTTGAAGGAGACGTACA
 AAGTGTCTTGAGTCTTCCAGTAAAGAGCCCTCTCTGAAAGCCTTGTAAGAAGT**GTGAGTTACATTTT**

Esone 0d = 17 b

PC
 ↓CTTTTCGCTGATGGGAG**GTGAGTGTGCATGG**

Esone 1a = 216 b lunghezza massima

Pl-t1 Pl-t2
 ↓AAGCCTCCAGCAGCTGACGGGACCCAGCTGTAGTGAGGTTGCAGTGATTGAGTAGGATTGGCC↓TGCTTCAA
 Co-t3
 AGCAGAGGTTTCTCATGGGAATATGCTTATT↓AAACTCCCCTGGTGCAGAAACCATGAACAGAGGATGAACA
 AGTGAAGTTGCAATCTCCTCCATCACAGCTCAGTTCCCCAACACAGGATCACAAGCTGGAGATGCCTTTAAG
GTAAAGCGTCTATTC

Esone 1b = 129 b

CATCTTTTGAATGAATTCACA**AG**GAAGAGCCCGATGCCCTTGGTTTACTCTACTAAGAGCCCTCAGTTGCTG
 AACCTGCACAC (T) AGTCATCTCAGTAAGTTAAGATCTTCTGAGGACA**ATG**GCGCAAGATCGTCTTCAGCTG
 TTCATAGCC**CAAGTATGAGAGG**

APPENDICE

Esone 1c = 153 b

Ovt2

Ty-t1

LMN-t1

AGTTTTGTCTCCTGATGTCAGGGTCAGAGCCACAGAGACTTGGTTCTGGAAGTA TTTGAGAGT AAGAACC
TGGCT AAGGCTGTGAACCAGTTGCTGGGAGAGGTGTTGCCTACCCTGCTGGTGGGAAGACTAGAAGGACAT
CGATATTGAG **GT AAGTAAGACCTC**

Esone 1e = 73 b

PC

CATTGTTTCTTAGCTGTCTCTTCACGTGTACCTGTCTCTCTATCTGTATTTGGACACCTGGGCTGAGTCA
TCTTCATGTCTTAG **GTATGCAACTCTCT**

Esone 2 = 141 b

CTTGTCTTTACAGGAAG **ATG**AAGATCCCTTTCCTCCTACTGTTCTTTCTGTGGGAAGCCGAGACCACGCAGC
ATCAAGGCCGAACATCATCCTGGTGATGGCTGACGACCTCGGCATTGGAGATCCTGGGTGCTATGGGAACAAA
ACTATCAG **GT TGGTAATGCAGC**

Fig. 24. sequenze dei differenti primi esoni e dell'esone 2 comune a tutte le varianti trascrizionali identificate del gene STS. Vicino al nome di ogni esone viene indicata la lunghezza massima misurata in questo lavoro. In grassetto rosso è riportata parte dei nt degli introni con relativi siti di *splicing* al 5' e al 3'. I siti putativi di inizio traduzione sono evidenziati in giallo, mentre i siti di sostituzione nucleotidica sono evidenziati in viola. Le frecce indicano la posizione dei TSS di ciascun primo esone nei differenti tessuti esaminati. PC: linea cellulare di carcinoma prostatico PC-3; DU: linea cellulare di carcinoma prostatico DU-145; Ovs1: ovario sano del campione 1; Ovt1: ovario tumorale del campione 1; Ovt2: ovario tumorale del campione 2; Endo: utero

Alessia Nardi:

Pubblicazioni

Nardi A., Pomari E., Zambon D., Belvedere P., Colombo L., Dalla Valle L. *Transcriptional control of human steroid sulfatase* J Steroid Biochem Mol Biol., (2009) In revisione

Pomari E., **Nardi A.**, Fiore C, Celeghin A., Colombo L., Dalla Valle L. *Transcriptional control of human organic anion transporting polypeptide 2B1 gene.*J Steroid Biochem Mol Biol., (2009) In revisione

Fiore C., **Nardi A.**, Dalla Valle L., Pellati D., Krozowski S., Colombo L., Armanini D. *Identification of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA and protein in human mononuclear leukocytes.* Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes, (2009) in stampa

Dalla Valle L, Toffolo V, **Nardi A**, Fiore C, Armanini D, Belvedere P, Colombo L. *The expression of the human steroid sulfatase-encoding gene is driven by alternative first exons.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2007; 107(1-2):22-9.

Dalla Valle L, Toffolo V, **Nardi A**, Fiore C, Bernante P, Di Liddo R, Parnigotto PP, Colombo L; *Tissue-specific transcriptional initiation and activity of steroid sulfatase complementing dehydroepiandrosterone sulfate uptake and intracrine steroid activations in human adipose tissue.* Journal of Endocrinology 2006 190, 129-139

Eckhart L, Valle LD, Jaeger K, Ballaun C, Szabo S, **Nardi A**, Buchberger M, Hermann M, Alibardi L, Tschachler E. *Identification of reptilian genes encoding hair keratin-like proteins suggests a new scenario for the evolutionary origin of hair.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. In press.

Dalla Valle L, **Nardi A**, Gelmi C, Toni M, Emera D, Alibardi L. *Beta-keratins of the crocodilian epidermis composition, structure, and phylogenetic relationships.* J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2008. In press.

Dalla Valle L, **Nardi A**, Belvedere P, Toni M, Alibardi L. *Beta-keratins of differentiating epidermis of snake comprise glycine-proline-serine-rich proteins with an avian-like gene organization.* Dev Dyn. 2007; 236(7):1939-53.

Dalla Valle L, **Nardi A**, Toffolo V, Niero C, Toni M, Alibardi L. *Cloning and characterization of scale beta-keratins in the differentiating epidermis of*

geckoes show they are glycine-proline-serine-rich proteins with a central motif homologous to avian beta-keratins. Dev Dyn. 2007; 236(2):374-88.

Partecipazione a congressi

Partecipazione al “18th International Symposium of Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology” Seefeld, Tyrol Austria 18-21 settembre 2008

Partecipazione al “23rd Conference of European Comparative Endocrinologists 2006”, Manchester, Inghilterra, 29 agosto – 2 settembre

Corsi

VI Seminario Leica Microsystem: “Microscopia confocale e sue applicazioni” Roma 20-23 Giugno 2007

Corso Teorico Pratico sull’utilizzo delle autoclavi da laboratorio 22 giugno 2006, Padova

Corso Teorico Pratico: Microdissezione Laser: Tecnologia ed Applicazioni. 21-22 settembre 2006, Padova

Corso Teorico Pratico sull’utilizzo delle centrifughe (Beckman Coulter) 22 novembre 2006 Padova

Attività didattiche

Co-tutor della Tesi di Laurea di Primo Livello in Biologia, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università degli Studi di Padova: Eulalia Guerrini (a.a. 2007/2008), “Analisi in differenti tessuti umani delle varianti della regione 5’-terminale (5’-UTR) dei trascritti del gene codificante il trasportatore di anioni organici, OATP-B”.

Co-tutor della Tesi di Laurea di Primo Livello in Biologia, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università degli Studi di Padova: Stefano Quinzani (a.a. 2007/2008), “Analisi Immunoistochimica dell’enzima Steroide Solfatasi e del trasportatore anionico OATP2B1 in tessuti umani”

Correlatrice della Tesi di Laurea Specialistica in Biologia Evoluzionistica, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università degli Studi di Padova: Andrea Celeghin (a.a. 2007/2008), “Analisi delle varianti trascrizionali della

Steroide Solfatasi, del Citocromo P450arom e della proteina trasportatrice di anioni organiciB (OATP-B)".

Attività di didattica di supporto all'insegnamento di "Metodologie Biologiche" modulo B, per il corso di Laurea di Primo Livello in Biologia Generale, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., a.a. 2005/2006, 1 modulo (25 ore di attività di laboratorio).

Attività di didattica di supporto all'insegnamento di "Metodologie Biologiche" modulo B, per il corso di Laurea di Primo Livello in Biologia Generale, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., a.a. 2006/2007, 1 modulo (50 ore di attività di laboratorio).

Attività di didattica di supporto all'insegnamento di "Metodologie Biologiche" modulo B, per il corso di Laurea di Primo Livello in Biologia Generale, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., a.a. 2007/2008, 1 modulo (50 ore di attività di laboratorio).

Borse di studio ed esperienze di ricerca

Da maggio 2008 a luglio 2008 Contratto di lavoro autonomo occasionale a favore di Biological Researches Soc. Coop. a.r.l. Relativa all'attività di interpretazione di analisi di biologia molecolare.

Da ottobre 2005 a dicembre 2005: Borsa di studio presso il laboratorio di Endocrinologia Comparata del Prof. L. Colombo nel Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova, relativa alla ricerca su "Potenziale steroidogenico in tessuti ghiandolari ed extraghiandolari di vertebrati"

Da ottobre 2004 a ottobre 2005: Borsa di studio presso il laboratorio di Endocrinologia Comparata del Prof. L. Colombo nel Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova, relativa alla ricerca su "Messa a punto di metodiche diagnostiche quantitative per il rilevamento del nodavirus dei pesci marini e indagini epidemiologiche".

Da aprile 2004 ad agosto 2004: Borsa di studio presso il laboratorio di Endocrinologia Comparata del Prof. L. Colombo nel Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Padova, relativa alla ricerca su "Regolazione, mediata da glucocorticoidi e steroidi sessuali della massa del tessuto adiposo nell'uomo e nella donna in condizioni normali e patologiche".