



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

XXIII CICLO DOTTORATO DI RICERCA IN
TERAPIA PEDIATRICA E FARMACOLOGIA DELLO SVILUPPO

**Ruolo del gene ATP7B nella resistenza al
cisplatino ed ai suoi analoghi**

Relatore:

Dott. Georgios Loudianos

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Maria Cristina Noli

Coordinatore Scientifico: **Prof. Renzo Galanello**

Anno Accademico 2009-2010

(Settore scientifico disciplinare di appartenenza MED/03)

Indice

	pag.
1. Introduzione	3
2. La malattia di Wilson	9
2.1 Epidemiologia	9
2.2 Patogenesi	10
2.3 Proteina	11
2.4 Sintomi clinici	13
2.5 Diagnosi	14
2.6 Terapia	14
2.7 Genetica	15
3. La regione 5' UTR del gene ATP7B	17
4. Obiettivo dello studio	20
5. Materiali e Metodi	21
5.1 Polymerase chain reaction	25
5.2 Clonaggio	26
5.3 Sequenziamento	28
5.4 Studi di espressione	30
6. Risultati	34
7. Discussione	42
8. Bibliografia	51

1. Introduzione

Gli studi molecolari sui tratti geneticamente trasmessi focalizzano l'attenzione sulle sequenze di DNA codificanti proteine. Questo riflette il fatto che, mutazioni patogeniche esercitano i loro effetti funzionali alterando la struttura della proteina codificata da un gene mutato. In realtà il genoma umano possiede meno geni codificanti proteine di quanto ci si aspetti (1, 2).

Tale osservazione comunque, sottolinea l'importanza della regolazione genica nell'influenzare sia le malattie complesse che i più semplici disordini genetici (3, 4).

Questi, insieme, rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità umana, per questo capire i loro meccanismi molecolari è una priorità della ricerca scientifica (5).

Le variazioni di sequenza caratterizzate dalla sostituzione di una singola base o dalla delezione di una o poche basi, sono generalmente indicate come polimorfismi o SNPs, Single Nucleotide Polymorphism, termine che fa riferimento alla frequenza con cui il polimorfismo compare nella popolazione o al numero di basi coinvolte.

Gli SNPs presenti nei geni possono influenzare il fenotipo cambiando la qualità o la quantità della proteina codificata. Questi cambiamenti sono trasmessi dal gene alla proteina attraverso l'mRNA e riguardano la quantità di mRNA codificante, modificazioni nella sua sequenza e il grado di traduzione dell'mRNA in proteina (6).

Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane e sono presenti ogni circa 100-300 paia di basi lungo l'intero genoma umano (7).

Essi si trovano dislocati tra le regioni codificanti, negli introni e nei promoter e si pensa che il genoma umano ne contenga circa un milione (8).

Il promoter di un gene è la più semplice regione regolatrice di un gene. In esso sono presenti diversi fattori trascrizionali (TF) che modulano la corretta espressione genica (9). I promoters sono fra i più importanti elementi cis-acting (un elemento cis-acting è una sequenza di DNA che, tramite fattori di trascrizione, regola l'espressione di un gene sullo stesso cromosoma). I

promoters sono coinvolti nell'inizio della trascrizione ed è possibile che contengano polimorfismi funzionalmente rilevanti nella regolazione dell'espressione genica (10).

Nella regione centrale del promoter sono presenti delle sequenze consensus come la TATA box, che viene riconosciuta come la regione che facilita l'attacco della RNA polimerasi II, enzima che dà inizio alla trascrizione. Nei promoters umani, questa regione è spesso assente e l'RNA polimerasi II utilizza altri siti per iniziare correttamente la trascrizione (11).

Nel promoter infatti esistono altri elementi in grado di assolvere a questo compito come l'inziatore (Inr), l'elemento a monte del promoter (DPE), l'elemento di riconoscimento di TFIIB (BRE). Questi vengono riconosciuti da diversi fattori trascrizionali indicati genericamente con TFII seguito da una lettera diversa che indica i diversi fattori (6).

Affinché la trascrizione abbia inizio è sempre necessario l'intervento di TFIID, formato dalla TBP (TATA Binding Protein) associata a fattori TAF (TBP Associated Factors). TFIID deve necessariamente legarsi al DNA, sia che ci sia una TATA box sia che non ci sia. Il fattore TFIIA stabilisce il legame tra TFIID e il DNA.

TFIIB si lega a TFIID seguito dall'attacco dell'RNA polimerasi II in associazione con TFIIF, infine, TFIIE e TFIIH si uniscono al complesso (6).

TFIIH è un fattore composto da diverse subunità, una di queste è una proteina chinasi che fosforila sequenze ripetute presenti nel dominio C-terminale della subunità più grande della RNA polimerasi II.

La fosforilazione di queste sequenze rilascia la polimerasi dalla sua associazione con il complesso di inizio, permettendo di procedere lungo lo stampo e allungare la catena di RNA in crescita.

La distruzione di questi siti di legame per i fattori di trascrizione (TFBS) potrebbe avere degli effetti negativi sulla trascrizione (6).

Anche la struttura del DNA riveste un importante ruolo, caratteristiche come curvatura, flessibilità e stabilità sono fondamentali nel permettere alle proteine trascrizionali di appaiarsi e legarsi alle sequenze consensus affinché esercitino i loro effetti sull'espressione genica (12).

Il DNA con una certa curvatura spesso è localizzato vicino a regioni di controllo trascrizionale come a monte della TATA box (13, 14). L'inserzione a monte della TATA box di una o più copie di una sequenza di DNA intrinsecamente curvato, fa aumentare la trascrizione di cento volte. Cambiamenti in questa sequenza, come l'eliminazione della curvatura del DNA, riducono invece la trascrizione del 70% (15).

La flessibilità del DNA dipende dalla sua sequenza e determina la facilità con cui esso può curvarsi in ogni direzione (16), il suo aumentare facilita il legame dei fattori di trascrizione (17). Per esempio, quando due fattori trascrizionali cercano di legarsi al TFBS contemporaneamente, se il DNA fosse rigido, essi non potrebbero legarsi nello stesso momento a causa dell'ingombro sterico (18).

Infine, la bassa stabilità del DNA aiuta la denaturazione del DNA da parte della DNA polimerasi, in questo modo viene aiutata anche la trascrizione. La stabilità del DNA per diventare a singolo filamento dipende dalla temperatura di melting (T_m) o denaturazione che a sua volta dipende sia dalla lunghezza totale della molecola di DNA sia dalla specifica sequenza dei nucleotidi (12).

La tecnica più ampiamente usata per studiare il promoter di un gene è l'assay del gene reporter nella quale il promoter viene clonato in un plasmide che contiene la sequenza codificante di un gene reporter facilmente quantificabile, in questo modo l'attività relativa al promoter può essere determinata sulla base della quantità della proteina espressa dal gene reporter in seguito alla transfezione del plasmide in una coltura cellulare (19).

E' questa la tecnica utilizzata anche per lo studio del promoter del gene ATP7B, coinvolto nella malattia di Wilson, in cui è stata trovata una sola mutazione, la -441/-427del15, che è una delezione di 15 nucleotidi. La caratterizzazione funzionale di questa mutazione, che è la più comune in Sardegna con una frequenza allelica del 62%, ha rivelato una diminuzione dell'attività del promoter di circa il 75%.

Ancora, in seguito a nostri studi non pubblicati, nel promoter sono state individuate due rare variazioni di sequenza in alcuni pazienti Wilson, senza mutazioni identificate nel gene ATP7B. Queste sono: la -224G>A trovata in

cis con le variazioni di sequenza: -404/-403CG>TT; -525C>T; -413T>C; -123/-119ins>del5 e -75A>C; e la -247C>A trovata in cis con le variazioni di sequenza: -525C>T; -413T>C; -123/-119ins>del5 e -75A>C. Mentre la -404/-403CG>TT è una doppia sostituzione nucleotidica rara, la -525C>T, la -413T>C, la -123/-119ins>del5 e la -75A>C sono abbastanza frequenti e già descritte in pazienti Wilson con mutazioni note nel gene ATP7B e nella popolazione normale.

Si è cercato di chiarire meglio il ruolo di tutte queste variazioni di sequenza, così come era stato fatto per la mutazione -441/-427del15, attraverso l'assay del gene reporter, utilizzando la linea cellulare di epatoma umano HepG2.

I risultati hanno rivelato che, la -224G>A quando trovata in cis con: -404/-403CG>TT; -525C>T; -413 T>C; -123/-119ins>del5 e -75A>C; e la -247C>A quando trovata in cis con -404/-403CG>TT; -525C>T; -413T>C; -123/-119ins>del5 e -75A>C; mostravano una normale espressione del gene reporter, mentre, la rimozione selettiva di quelli che sono considerati i polimorfismi del promoter, dava come risultato una variazione dell'attività del promoter.

Questi risultati conferiscono a questi polimorfismi un potenziale ruolo di polimorfismi regolatori (rSNPs) nell'espressione del gene ATP7B.

L'inserimento delle variazioni di sequenza rare nel contesto degli aplotipi più frequenti, dati a loro volta dalle diverse combinazioni delle variazioni nucleotidiche più frequenti, si traduce nella presenza di diversi promoter con differenti caratteristiche di sequenza, ossia in altri aplotipi.

I successivi studi funzionali su questi promoter, utilizzando sempre linee cellulari di epatoma umano HepG2, sono stati condotti sia in condizioni basali che con l'aggiunta di rame. I risultati sui diversi aplotipi analizzati, hanno rivelato una maggiore attività dei promoter indotti con il rame rispetto a quelli non indotti.

Per indagare ancora più a fondo sulle molteplici potenzialità del promoter, chiarita l'importanza del ruolo che il rame ha nella sua attività ed essendo nota la relazione esistente tra il rame e la proteina ATP7B, potrebbe essere utile associare queste considerazioni ai diversi studi che rivelano che, i

principali trasportatori del rame, come la proteina CTR1 (che ne permette l'ingresso nelle cellule) e le P-ATPase, ATP7A e ATP7B (che controllano la rimozione del rame dalle cellule), regolano anche l'assorbimento, il metabolismo e l'eliminazione dei farmaci al platino nella cellula tumorale (20, 21, 22).

Inoltre, cellule tumorali resistenti al rame presentano anche resistenza al platino, e in entrambi i casi vi è associata una iperespressione della proteina ATP7B (23, 24).

Per questo, ipotizzando un coinvolgimento della regione del promoter del gene ATP7B, e in particolare dei polimorfismi ad esso associati nell'attività del promoter, si potrebbe testare questa ipotesi studiando questa regione attraverso la tecnica del gene reporter oltre che in condizioni basali e di induzione col rame, anche tramite l'induzione col platino.

La chemioterapia con farmaci a base di platino come il cisplatino e i suoi analoghi carboplatino e oxaliplatino, è ampiamente utilizzata in diversi tipi di tumori umani: testicolo, ovaio, stomaco, utero, esofago, vescica, polmone, testa e collo, linfomi, colon, seno e altri (25). Le maggiori limitazioni all'uso di questo chemioterapico sono rappresentate dalla nefrotossicità e dalla resistenza al farmaco (26).

L'attività antitumorale del cisplatino è strettamente correlata alla sua capacità di legare il DNA e di formare degli addotti capaci di arrestare la replicazione, inibire i meccanismi di trascrizione, arrestare il ciclo cellulare, riparare il DNA e attivare i processi di morte cellulare per apoptosi (27).

La riduzione della formazione di un addotto del cisplatino con il DNA può essere un meccanismo di resistenza, così come la diminuzione dell'accumulo intracellulare del cisplatino (28), la sua inattivazione attraverso l'aumento dei livelli di glutatione e di attività della glutatione S-transferasi (GST) (29, 30) e l'alterazione dell'efficienza di sistemi di riparazione del DNA, per esempio l'aumento dell'attività del nucleotide excision repair (NER), (31). Un altro meccanismo di resistenza al cisplatino è rappresentato dal sistema di trasporto. La capacità che hanno i farmaci antitumorali di entrare nelle cellule e di raggiungere una concentrazione adeguata in alcuni compartimenti intracellulari

è un fattore determinante per l'efficacia di un farmaco chemioterapico. Le cellule possono anche esprimere proteine di trasporto che contribuiscono all'aumento o alla riduzione dei livelli intracellulari dei farmaci somministrati. Nel caso di farmaci a base di platino, la diffusione passiva era ritenuta l'unico meccanismo di trasporto. Tuttavia, come già detto, è stato scoperto che l'ingresso del cisplatino, del carboplatino e dell'oxaliplatino, può essere mediato dagli stessi trasportatori del rame (32). Questo indica che i farmaci antitumorali a base di platino possono essere introdotti, distribuiti a vari compartimenti cellulari ed espulsi dalle cellule tumorali anche attraverso il sistema di trasportatori di membrana e di trasportatori solubili ("chaperone") che sovrintendono al mantenimento dei livelli omeostatici degli ioni rame (33). I meccanismi molecolari alla base di tali processi sono tuttora sconosciuti. Evidenza del fatto che, farmaci al platino entrano e si distribuiscono in diversi compartimenti subcellulari attraverso trasportatori che sono coinvolti nella gestione dell'omeostasi del rame, è data da:

1. resistenza crociata bidirezionale tra cellule selezionate per la resistenza sia ai farmaci al platino che al rame (34);
2. cambiamenti paralleli in cellule resistenti nel trasporto di farmaci al platino e al rame (34);
3. sensibilità citotossica alterata e accumulo di farmaci al platino in cellule transfettate con trasportatori di rame (35);
4. alterata espressione dei trasportatori del rame nei tumori resistenti ai farmaci al platino (36);

Lo studio di linee cellulari tumorali sensibili e resistenti al trattamento con i farmaci al platino, potrebbe cercare di chiarire l'associazione tra la resistenza al farmaco e l'iperespressione della proteina ATP7B. Essendo la regione del promoter ampiamente coinvolta nell'espressione dei geni, potrebbe essere utile prenderla in esame.

2. La malattia di Wilson

La malattia di Wilson è un raro disordine del metabolismo del rame a carattere autosomico recessivo (37) descritto per la prima volta da Kinnier Wilson nel 1912 (38).

Essa è caratterizzata dalla difettosa eliminazione del rame attraverso le vie biliari e dalla sua ridotta incorporazione nella ceruloplasmina. L'irregolare escrezione biliare determina un accumulo di rame nel fegato con conseguente danno epatocellulare.

Successivamente, quando l'organo è ormai saturo, il rame, per via ematica raggiunge altri distretti come cervello, reni, cornea, e, limitatamente, altri organi (39) .

Il gene coinvolto nella malattia di Wilson, il gene ATP7B, è stato identificato nel 1993 ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13 (40); esso codifica per una proteina transmembrana appartenente alla famiglia dei trasportatori dei metalli pesanti localizzata nella regione trans-Golgi degli epatociti.

La funzione della proteina di Wilson è quella di provvedere sia all'escrezione del rame attraverso le vie biliari sia alla sua incorporazione nella ceruloplasmina per la successiva eliminazione attraverso la via ematica.

2.1 Epidemiologia

La malattia di Wilson è presente in tutto il mondo con una frequenza di 30/milione e si stima che un individuo ogni 90 persone sia portatore della malattia (41).

Recenti studi epidemiologici indicano che in Sardegna la malattia ha un'incidenza di 1:2707 nati vivi, una delle più alte al mondo (42).

2.2 Patogenesi

Il rame è un metallo essenziale di molti cuproenzimi fondamentali per diversi processi metabolici quali la respirazione cellulare, la sintesi di neurotrasmettitori, la detossificazione dei radicali liberi, la maturazione del tessuto connettivo, il metabolismo del ferro (43, 44).

Tuttavia, il rame in eccesso può essere tossico in quanto può partecipare a reazioni di ossidoriduzione e incrementare la produzione di radicali liberi che provocano distruzione cellulare attraverso perossidazione dei lipidi della membrana cellulare, mitocondriale e lisosomiale, ossidazione delle proteine, rottura delle molecole di DNA ed RNA (45).

Per questo il rame è presente solo in tracce e l'organismo ha predisposto un meccanismo di protezione che ne consenta il suo corretto utilizzo e la sua rapida eliminazione attraverso la via biliare .

Il fegato, essendo l'organo deputato all'immagazzinamento e all'escrezione biliare del rame ha un ruolo fondamentale nel suo metabolismo, così come la ceruloplasmina (ferrossidase prodotta negli epatociti), deputata all'incorporazione del rame per la secrezione nel plasma (46, 47).

Nella malattia di Wilson l'assorbimento del rame e il suo trasporto dentro gli epatociti avviene normalmente. L'anomalia è nella tappa metabolica successiva, cioè nell'escrezione attraverso la via biliare e nel processo di incorporazione del rame nella ceruloplasmina. Tale difetto, conseguente ad una delle diverse mutazioni del gene ATP7B, risiede nell'assenza o nel malfunzionamento della proteina trasportatrice di rame P-ATPasi (38, 48).

Inizialmente il rame in eccesso è immagazzinato nel fegato, successivamente, il rame viene rilasciato in circolo e si deposita negli altri organi esplicando la sua tossicità.

Inoltre, la mancata incorporazione nella ceruloplasmina comporta la produzione di apoceruloplasmina, che non ha attività enzimatica e viene degradata rapidamente.

2.3 Proteina

La proteina ATP7B (Fig. 1) è una proteina di 170 kDa contenente otto regioni transmembrana e diversi domini funzionali. Il dominio citosolico N-terminale, contenente sei siti di legame per il rame; il dominio di legame per l'ATP, coinvolto nell'idrolisi dell'ATP e costituito da due parti: un dominio nucleotidico e un dominio di fosforilazione, rispettivamente N e P; un dominio A, che interagisce con il dominio di legame per l'ATP, richiesto per i cambiamenti conformazionali durante l'idrolisi dell'ATP e il dominio C-terminale che contiene determinanti strutturali per l'endocitosi (49)

ATP7B è una proteina trasportatrice di metalli pesanti attraverso le membrane che utilizza l'energia proveniente dall'idrolisi dell'ATP e che per questo viene chiamata P-ATPase (50).

E' localizzata nell'apparato del Golgi, precisamente nella regione trans-Golgi, e viene espressa nel fegato, nella placenta, nel cervello e nel rene.

Le sue funzioni sono: la formazione di un canale attivo del rame nelle membrane del trans-Golgi necessario alla mobilitazione del rame dal citosol per la sua successiva incorporazione nella apoceruloplasmina che porta alla formazione della forma matura della ceruloplasmina, e l'eliminazione del rame attraverso le vie biliari (51).

La proteina ATP7B, con i suoi meccanismi, non è l'unica a contribuire al mantenimento dell'equilibrio omeostatico del rame all'interno della cellula (Figura 2.)

Il rame infatti, entra all'interno della cellula attraverso CTR1, proteina che si trova sulla membrana cellulare in grado di formare dei pori sul plasmalemma e la cui capacità di favorire l'ingresso del rame dipende dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione di ioni K⁺ (52). Una volta nel citoplasma, il rame viene distribuito attraverso tre vie, ognuna specifica per un determinato distretto cellulare e che necessita di un determinato metallo-chaperone. Lo chaperone CCS per esempio, è responsabile dell'inserimento del rame nella superossido dismutasi 1 (SOD1), appartenente a una classe di metalloproteine ad azione antiossidante. Lo chaperone del rame COX17

invece, veicola il rame all'interno dei mitocondri, nei quali il pool di rame potrebbe rispondere alla necessità di rame del citosol (53). Per quanto riguarda la via escretoria del rame, lo chaperone ATOX1 è deputato al trasporto del rame alle due ATPasi, ATP7A e ATP7B, che, nonostante mostrino un'elevata omologia strutturale hanno un'espressione tessuto specifica. L'ATP7A è principalmente espressa a livello del cervello, dell'intestino, dei reni e della placenta, l'ATP7B, invece, è presente nel fegato e meno nel cervello. Le due ATPasi sono entrambe proteine transmembrana localizzate nell'apparato del Golgi (54).

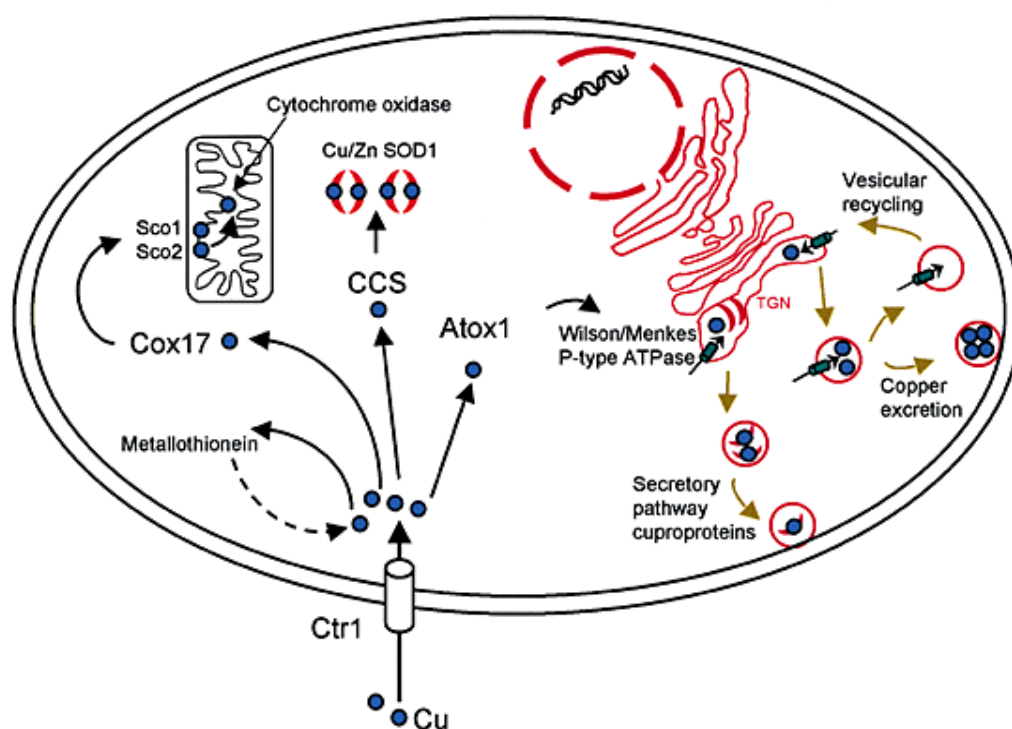


Figura 2. Rappresentazione schematica del trasporto e della distribuzione del rame all'interno della cellula

Il trasferimento del rame a queste due proteine avviene nella loro porzione N-terminale, nel dominio di legame per il metallo. Questo determina un cambiamento nella conformazione e nel pattern di fosforilazione di queste due proteine, che sono fondamentali per il trasporto del rame attraverso la membrana delle vescicole secretorie (50) così come per la migrazione di queste vescicole verso l'esterno attraverso la membrana cellulare (55, 56).

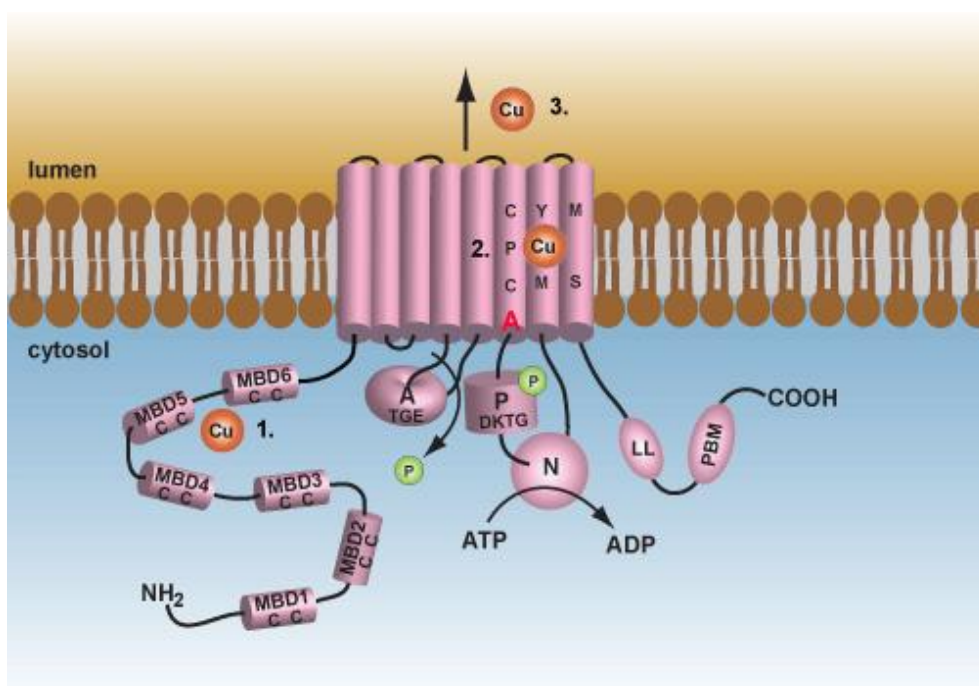


Figura 1. Proteina ATP7B

2.4 Sintomi clinici

I sintomi clinici si manifestano come conseguenza del danno tissutale dovuto al rame libero in eccesso. Anche se la malattia può rimanere asintomatica per lungo tempo, il rame libero inizia ad accumularsi immediatamente dopo la nascita e la sintomatologia può essere diversa e comparire a differenti età. I

sintomi possono essere epatici, neurologici, psichiatrici, oculari e renali, e raramente compaiono prima dei sei anni di vita. In età pediatrica la manifestazione epatica è la più frequente mentre negli adolescenti e nei giovani adulti si riscontra un maggior coinvolgimento neurologico e psichiatrico, oltre a quello epatico (57, 58).

2.5 Diagnosi

La condizione tipica per poter effettuare la diagnosi clinica della malattia di Wilson è la presenza della classica triade dei sintomi: epatopatia, interessamento neurologico e anello di Kaiser-Fleischer.

Inoltre, è fondamentale tener conto del decorso della malattia, della valutazione della storia familiare e degli esami di laboratorio quali: ceruloplasmina sierica (inferiore a 20 mg/dl), rame sierico (inferiore a 100 µg/dl), concentrazione del rame epatico (superiore a 250 µg/g), escrezione del rame nelle urine nelle 24h (superiore a 100 µmoli/24h) (59).

2.6 Terapia

Una volta diagnosticata, la malattia di Wilson viene efficacemente trattata con agenti chelanti il rame come la D-penicillamina, la trietilenetetramina e il tetrathiomolibdato di ammonio, somministrati per via orale e capaci di ridurre la sua concentrazione nell'organismo. Può avere successo anche la terapia atta a ridurre l'assorbimento del rame basata sulla somministrazione di zinco come sale solfato o acetato, soprattutto nei pazienti asintomatici e in fase di mantenimento terapeutico. Ricordiamo che la terapia è più efficace se iniziata in periodo presintomatico e che può essere utile seguire una dieta con cibi poveri in rame (60).

2.7 Genetica

Il gene ATP7B si trova sul cromosoma 13, tramite studi di linkage è stato individuato il locus genetico a livello della regione q14.2-q21.

E' costituito da 21 esoni distribuiti lungo circa 80 Kb di DNA genomico e il suo cDNA è di circa 1 Kb (61).

Lo studio delle basi molecolari della malattia di Wilson ha permesso di identificare circa 380 mutazioni, riportate nel database center dell'Università di Alberta (<http://www.medgen.med.ualberta.ca>).

Le mutazioni identificate appartengono a diverse categorie: nonsense, frameshift, sostituzioni nei siti di splicing, e, nella maggioranza, mutazioni missense (62).

Esiste un'alta eterogeneità allelica nella malattia di Wilson per la presenza di poche mutazioni relativamente frequenti e di un gran numero di mutazioni rare.

Inoltre, è presente una certa variabilità etnica per la prevalenza di certe mutazioni in determinate popolazioni (63). Per esempio, nella popolazione di origine asiatica, la mutazione R778L, ha una frequenza allelica di circa il 30%; in quella nord europea invece, la mutazione H1069Q risulta essere la più comune con una frequenza allelica del 40% circa (59). In Sardegna la mutazione più frequente è rappresentata da una delezione di 15 bp nella regione del promoter del gene ATP7B, la -421/-447del15, identificata in circa il 62% degli alleli. Quest'alta frequenza allelica suggerisce la presenza di un effetto fondatore dovuto all'isolamento della popolazione sarda e agli incroci tra consanguinei che hanno favorito la diffusione di diverse malattie genetiche (64). In Sardegna, esistono altre 5 mutazioni relativamente frequenti: la 213-214delAT, la 1512-1513insT, la R778W, la 2463delC e la V1146M che insieme alla -441/-427del costituiscono circa l'85% degli alleli, dato che suggerisce la presenza di un'alta omogeneità allelica nella malattia di Wilson in questa regione (42, 65, 66).

L'elevato numero di mutazioni diverse nel gene ATP7B è compatibile con la presenza di composti eterozigoti che, a causa della necessità di ricercare due differenti anomalie nei due diversi alleli, rende difficoltosa la diagnosi genetica della malattia (62).

3. La regione 5' UTR del gene ATP7B

La regione 5' UTR, a monte del gene ATP7B (Fig. 3), è stata isolata, sequenziata e caratterizzata. In essa sono stati messi in evidenza:

- una CAAT-box (67);
- una TATA-box (67);
- tre E-box (67);
- isole CpG, dove la somma tra le citosine e le guanine è del 65,4% (68, 69);
- diversi potenziali siti di legame per i fattori di trascrizione (Sp1, Ap1, Ap2, HNF-1, HNF-3, CTF-NF-1, C/EBP) (67);
- quattro regioni MRE (Metal Response Element) (67);
- sei sequenze MLS (Multiple MRE Like Sequenze) (67);

Le quattro regioni MRE (MREa; MREc; MREd; MREe), costituite da una regione consensus TGCRCNC dove R è una purina A o G ed N è un qualsiasi nucleotide (70), sono state trovate anche nel promoter del gene MT (vertebrate metallothionein) come regioni fortemente influenzate dei metalli pesanti (71).

Questo indica l'importanza del rame e altri metalli pesanti nella regolazione dell'espressione genica sottolineando che, nei geni regolati da metalli, la risposta al metallo è indipendente dalla posizione o dall'orientamento della regione MRE (72). Questo pare sia il caso anche del gene ATP7B, dove MRE potrebbe rappresentare un sito di legame per i fattori di trascrizione metallo-dipendenti giocando un importante ruolo nel controllo dell'attività trascrizionale del gene della malattia di Wilson.

Le sei sequenze MLS (indicate con la numerazione de 1 a 6) differiscono dalla sequenza consensus degli MRE per uno o due nucleotidi, questa similitudine riflette anche un'analogia funzionale tra MREs e MLSs (67).

Studi funzionali attraverso il saggio del gene reporter sul promoter del gene ATP7B, hanno dimostrato che i costrutti che non presentavano MLS2, MLS3, Sp1 e la CAAT-box, mostravano una diminuzione dell'attività del promoter del 50%.

Questo indica un effetto regolatore positivo di MLS2 e MLS3 che sono considerate come sequenze fortemente candidate al mantenimento della normale attività del promoter del gene della malattia di Wilson (67).

Per quanto riguarda le regioni MRE, anch'esse sono state studiate con l'utilizzo di un gene reporter per capire in che modo potessero influire sull'attività del promoter del gene ATP7B. I risultati hanno evidenziato che, fra tutte e quattro le regioni, variazioni di sequenza in prossimità di MREa risultano in una marcata diminuzione dell'attività del promoter, mentre, variazioni di sequenza negli altri MREs non mostrano significativi cambiamenti. Questo dimostra che MREa produce il maggiore effetto sull'attività del promoter. Inoltre, diversi studi hanno riportato che, l'MREa nel gene MT possiede una certa attività regolatoria trascrizionale e che diversi fattori trascrizionali nucleari interagiscono specificatamente con MREa. Queste scoperte suggeriscono che le proteine attivatrici della trascrizione che regolano l'espressione del gene ATP7B potrebbero legarsi a MREa (73). Va evidenziato che, altri MREs e altre MLSs potrebbero avere effetti regolatori, per esempio MLS6 e MREd si trovano in una regione a valle del sito d'inizio della trascrizione, studi futuri potrebbero chiarire meglio la loro rilevanza trascrizionale o post-trascrizionale (67).

In particolare, nel promoter del gene ATP7B sono state trovate due rare variazioni di sequenza proprio in prossimità di MLS6 e MREd, precisamente la -224G>A in MREd e la -247A>C in MLS6.

-1134 tcacctcaacaact **MLS3** tgcacaggcaccagctcctttcgccggccgccatcttccg -1081
 -1080 ccgacccccgaactca **-1064g>a** Ggaaacgcttcactttccttttccctattggctcctgagaaagc -1021
 -1020 aagccgtgc **Ap-2, Sp1** tcgccccgccccccacgggc **CAAT BOX** caattgtgcttact **CTF** attggttactggtagcc -961
 -960 gcttcccacggccttccagc **TATA BOX** caatagaatatgccgaggcgtagactagtgttcggcgtgg -901
 -900 cgcacacggctc **Sp1** ccgcccccgt **Sp1** gggcgggacagcagtggggg **-858insg C/EBP Ap-1, Ap-2** Gttgggc tgaggagggcg -841
 -840 tgcctgtgattgacagccgtcgtccctccctc **HNF-3** ggccacctccccactagaagcc **Sp1** ccc -781
 -780 gcctgggccc **MREa** tgcgcccccgttcccggcccaaagccc **Sp1** ccgcccgttgg **HNF-3** ggccattgg -721
Ap-1, Ap-2 -717g>c MREe **E-box**
 -720 ctgGcctt tgcgcacagcggatcgattttc caggtgcggagttcaactcttgccgcggtg -661
 -660 cttcctttgggacccacggcgtccggcagccaggcgcagagtcc **C/EBP** gaggagggggcagcgc -601
 -600 agagcggacccgacgcggcgccgc **-576c>g** Cgggcaccttcc **Ap-1, Ap-2** ccgcaggcggtgggtgagccctgg -541
 -540 gagctgagctcgcgg **-525t>c** Tccggctc **MLS4** tgcgcagct **E-box/MLS5** cacctgccctcccgtcccgcacacgcg -481
 -480 tgagatcccagtacagtgtcg **MREc** gagcgcaccagcgcgagg **HNF-3 -441/-427del** TGGCCGAGACCGCGGaggagg -421
-417g>t -413t>c Sp1 -404/-403cg>tt -401c>g
 -420 aca Ggcc Tccgccctg CGg Cgccggcacggcagaggacattgtggcactggcacggcaga -361
 -360 gaacactgtggcacc **Sp1** ggcggggccggcagttccagggtggcact **HNF-1/ E-box** cccagccacctgggg -301
 -300 agtgggaggggtccgaggcccactctcccctcacgctctcatccccg **MLS6 -247c>a** tgcccCaggtc -241
 -240 gggaggacggcg **MREd -224 g>a** gcgcGcaactttgaatcatccgtgtgaagagggctgcggttccccg -181
 -180 tcc **E-box** caaatgaag **Sp1** gggcggttcccggaccctgtttgctttagagccgagccgcgccg **-123/-119 del5** CGC -121
 -120 CGatgcctcacactctgcgcctcctctcccgggactttaacacc **-75a>c** Acgctctcctccacc -61
 -60 gaccaggtgaccttttgctctgagccagatcagagaagaattc -18

Figura 3. Sequenza nucleotidica della regione 5' UTR del gene ATP7B. Sono indicate le variazioni nucleotidiche studiate.

4. Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio è cercare di chiarire il ruolo che i diversi polimorfismi del promoter hanno sull'espressione della proteina della malattia di Wilson.

Essendo la regione del promoter ampiamente coinvolta nella regolazione dell'espressione dei geni, è questa la zona presa in esame.

Poiché la resistenza al rame e al platino è associata a un'iperespressione della proteina ATP7B, abbiamo indagato sulla capacità degli allotipi del promoter di indurre questa iperespressione, per verificare se fossero implicati nella resistenza al rame o al platino. Abbiamo aggiunto rame o platino per studiare se questo potesse creare alterazioni nell'attività del promoter in presenza dei polimorfismi.

5. Materiali e metodi

Il materiale dello studio ha incluso: una sostituzione nucleotidica rara, la -224G>A, trovata in un paziente di origine turca, ma non identificata in 100 cromosomi normali e in 100 cromosomi di pazienti con la malattia di Wilson della stessa origine.

Due sostituzioni nucleotidiche rare, la -403/-404CG>TT e la -247A>C, trovate in cis in due pazienti di origine albanese ma non identificate in 100 cromosomi di origine mediterranea.

Altre varianti di sequenze rare, trovate in pazienti con la malattia di Wilson senza mutazioni identificate nel gene ATP7B sono: la -1064G>A; la -858insG; la -717G>C; la -576C>G; la -401C>G (Fig. 4).

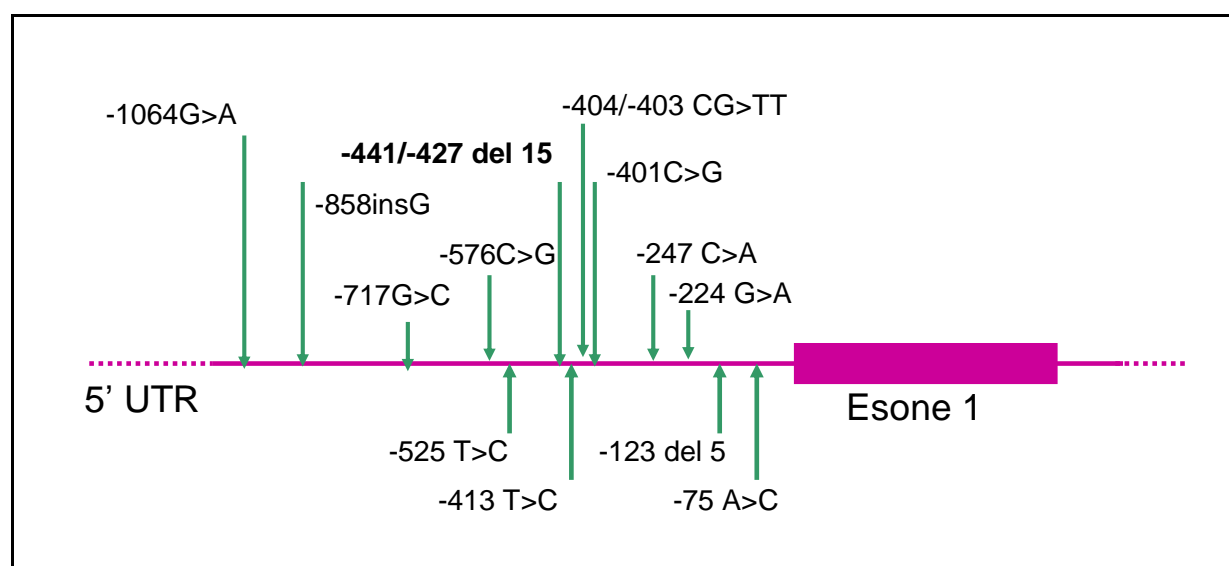


Figura 4. Rappresentazione schematica della distribuzione delle variazioni di sequenza nel promoter del gene ATP7B.

Tutte queste variazioni avvengono in un determinato contesto aplotipico, determinato da variazioni di frequenza relativamente frequenti: la -75A>C; la -123/-119ins>del5; la -413 T>C; la -525 C>T (Tabella 1).

Polimorfismi	Frequenza cromosomi normali	Frequenza cromosomi mutati
-525T>C	47%	50%
-413T>C	85%	81%
-123/-119ins>del5	48%	49%
-75A>C	64%	72%

Tabella 1. Polimorfismi più frequenti del promoter in cromosomi normali e in cromosomi di pazienti con la malattia di Wilson.

Le variazioni nucleotidiche più frequenti, combinate fra loro, danno origine a degli aplotipi presenti con diverse frequenze sia nella popolazione Wilson, che in quella non Wilson e di queste due insieme (Tabelle 2-3-4).

-75A>C	-123/-119ins>del	-413T >C	525T>C	254 cromosomi	100,00%
A	ins	T	T	135	52,73%
C	del	T	C	53	20,70%
A	del	C	C	34	13,28%
A	del	T	C	25	9,76%
A	del	T	T	5	1,95%
A	ins	C	C	2	0,78%
A	ins	C	T	1	0,39%
C	ins	T	C	1	0,39%

Tabella 2. Aplotipi del promoter identificati nei cromosomi dei pazienti con la malattia di Wilson.

-75A>C	-123/-119ins>del	-413T >C	525T>C	254 cromosomi	100,00%
A	ins	T	T	120	47,24%
C	del	T	C	75	29,52%
A	del	C	C	32	12,60%
A	del	T	C	17	6,69%
A	ins	T	C	6	2,36%
A	ins	T	T	2	0,79%
C	del	T	T	1	0,39%
A	del	T	T	1	0,39%

Tabella 3. Aplotipi del promoter identificati nei cromosomi della popolazione normale.

-75A>C	-123/-119ins>del	-413T >C	-525T>C	510 cromosomi	100,00%
A	ins	T	T	255	50,00%
C	del	T	C	128	25,09%
A	del	C	C	66	12,94%
A	del	T	C	42	8,23%
A	del	T	T	6	1,18%
A	ins	T	C	6	1,18%
A	ins	C	C	2	0,39%
C	ins	T	T	2	0,39%
A	ins	C	T	1	0,20%
C	ins	T	C	1	0,20%
C	del	T	T	1	0,20%

Tabella 4. Aplotipi del promoter identificati nei cromosomi dei pazienti con la malattia di Wilson e della popolazione normale.

Le variazioni di sequenza rare, inserite nel contesto aplotipico dei quattro aplotipi più frequenti in assoluto (Tabella 5), danno delle combinazioni di varianti nucleotidiche che sono quelle utilizzate nel nostro studio (Tabella 6). In tabella 6 sono riportati i dodici costrutti presi in esame, costituiti da variazioni nucleotidiche rare combinate con i quattro aplotipi più frequenti. Vedremo se, i polimorfismi sono in qualche modo capaci di influenzare l'attività del promoter del gene ATP7B ma anche se hanno un ruolo nella resistenza al rame e al platino. Oltre a quelli presi in esame, abbiamo creato altri costrutti attraverso la mutagenesi sito specifica, tecnica mediante la quale una mutazione è creata in modo selettivo in un particolare sito di una molecola di DNA. Questi nuovi costrutti sono pronti per essere utilizzati in futuri studi funzionali sul promoter.

Aplotipi				Frequenza cromosomi normali	Frequenza cromosomi mutati
-75A	-123/-119ins5	-413T	-525T	44,90%	50,25%
-75C	-123/-119del5	-413T	-525C	31,30%	24,70%
-75A	-123/-119del5	-413C	-525C	12,60%	13,28%
-75A	-123/-119del5	-413T	-525C	7,00%	17,40%

Tabella 5. Aplotipi più frequenti del promoter identificati nei cromosomi della popolazione mista.

1	- 525T	-413T	-123/-119ins5	-75A	
2	- 525C	-413T	-123/-119del5	-75C	
3	- 525C	-413C	-123/-119del5	-75A	
4	- 525C	-413T	-123/-119del5	-75A	
5	- 717C	-525T	-413T	-123/-119ins5	-75A
6	- 858insG	-525T	-413T	-123/-119ins5	-75A
7	- 525T	-413T	-401G	-123/-119ins5	-75A
8	- 525C	-413T	-404/-403TT	-247A	-123/-119del5 -75C
9	- 525C	-413T	-247A	-123/-119del5	-75C
10	- 576G	-525C	-413T	-123/-119del5	-75C
11	- 525C	-413C	-224A	-123/-119del5	-75A
12	- 1064A	-525C	-413T	-123/-119del5	-75A

Tabella 6. Costrutti presi in esame in questo studio.

5.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Per poter ottenere un elevato numero di copie della regione di DNA di interesse, nel nostro caso quella compresa tra la posizione nucleotidica -1134 e la posizione nucleotidica +18, i campioni in esame sono stati sottoposti alla Polymerase Chain Reaction o PCR.

La PCR consiste nell'amplificazione enzimatica di una data regione del genoma.

La miscela di amplificazione è stata preparata in un volume finale di 50 µl e conteneva:

- due primers (forward e reverse) fiancheggianti la regione da studiare;

primer forward: 5' tcacctcaacaacttgacag 3'

primer reverse: 5' tctctctgctcaggcat 3'

- 200 μ M di quattro desossiribonucleosidi trifosfati (dNTPs);
- 2 U di Taq Polimerasi;
- buffer 10x contenente 1,5 mM di $MgCl_2$;
- 100 ng di DNA genomico;

Le condizioni di amplificazione sono state:

- denaturazione iniziale a 95°C per 5'
 - denaturazione a 95°C per 30''
 - annealing a 58°C per 30''
 - estensione a 72°C per 1'
 - estensione finale a 72°C per 10'
- } 30 cicli

Durante la denaturazione i due filamenti stampo del DNA a doppia elica si separano.

Durante l'annealing (ibridazione dei primers) ciascun primer si lega alla terminazione del filamento che si vuole amplificare.

Durante l'estensione la Taq Polimerasi aggiunge nucleotidi ai primers producendo una copia complementare al DNA stampo.

Ripetuti cicli di denaturazione, annealing ed estensione, in cui i filamenti sintetizzati servono da stampo per i cicli successivi, producono un accumulo esponenziale di copie della sequenza di DNA.

Lo strumento utilizzato per la PCR è un termociclatore ed i prodotti ottenuti vengono visualizzati su un transilluminatore a raggi UV dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio.

5.2 Clonaggio

Tutti i frammenti ottenuti dalla PCR sono stati clonati in un vettore plasmidico, pCR®2.1-Topo Cloning (Invitrogen).

L'attacco del frammento di DNA nel vettore plasmidico è avvenuta tramite la reazione di ligazione. Per averne una quantità maggiore, i plasmidi ottenuti con il clonaggio sono stati amplificati attraverso la tecnica della trasformazione di cellule batteriche competenti all'acquisizione del plasmide. Sono state utilizzate cellule di Escherichia Coli TOP10 (Invitrogen). Durante la trasformazione il vettore con il DNA entra nelle cellule e si replica.

Una volta trasformate, le cellule sono state piastrate su piastre Petri con terreno solido selettivo LB-agar contenente come antibiotico ampicillina 100 µg/ml.

Dopo incubazione a 37°C per tutta la notte (O/N), sono comparse le colonie batteriche.

La selezione delle colonie contenenti il frammento d'interesse è avvenuta casualmente, infatti, non tutte le colonie potevano aver assunto il plasmide in questione.

Da ogni piastra di cellule batteriche, abbiamo effettuato l'inoculo di una singola colonia in 3 ml di brodo LB con ampicillina 100 µg/ml all'interno di un tubo batteriologico da 15 ml, in ambiente aerobio. Affinché la coltura di cellule batteriche raggiungesse la fase di crescita stazionaria, il tubo batteriologico è stato incubato O/N a 37°C in agitazione.

Al termine dell'incubazione, è stata effettuata l'estrazione del DNA plasmidico su piccola scala (Miniprep). Un'aliquota di DNA plasmidico così estratto, è stato digerito con un'enzima di restrizione EcoRI. L'avvenuta digestione è stata verificata tramite la semina di una piccola aliquota di DNA digerito, con a fianco un marcatore, su un gel di agarosio all'1% colorato con bromuro di etidio.

Dopo questa verifica, abbiamo seminato tutta la digestione in un gel di Low Melting all'1,5% e proceduto al taglio del gel con la banda corretta, a questo punto abbiamo provveduto alla purificazione del DNA della banda col kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen).

Il DNA dei nostri costrutti di partenza così ottenuto, è stato quindi subclonato in un sito di restrizione EcoRI di un vettore di espressione

pRL-null (Promega) contenente il cDNA della luciferasi di Renilla come gene reporter.

L'inserimento del DNA liberato dal vettore plasmidico Topo Cloning nel vettore di espressione pRL-null, è avvenuto tramite una reazione di legazione con l'utilizzo dell'enzima T4 Ligase a 16°C O/N, con un rapporto tra vettore pRL-null e DNA di 1:4.

Questi nuovi cloni sono stati anch'essi amplificati, sempre attraverso la tecnica della trasformazione di cellule competenti all'acquisizione del plasmide. Questa volta le cellule utilizzate erano XL1-Blue.

Dopo la trasformazione abbiamo piastrato le cellule sul terreno LB-agar con ampicillina 100 µg/ml. Dopo l'incubazione O/N a 37°C e la comparsa delle colonie sulla piastra Petri, abbiamo inoculato una colonia in un tubo batteriologico lasciato poi O/N a 37°C, in agitazione e in ambiente aerobio. Dopo l'estrazione dei DNA plasmidici (Miniprep) da queste cellule, essi sono stati digeriti con l'enzima Accl per verificare che i costrutti fossero inseriti nel vettore pRL-null secondo il giusto orientamento 5'-3'. La conferma a questo è avvenuta in seguito alla semina dei DNA digeriti su un gel di agarosio al 2%, che ha rivelato la presenza di due bande, una di 4213 bp, e l'altra di 236 bp.

I frammenti orientati in 3'-5' invece, erano caratterizzati da una banda di 3536 bp e da una banda di 913 bp.

5.3 Sequenziamento

L'integrità di tutti i costrutti è stata verificata attraverso il sequenziamento ciclico o "cycle sequencing".

La reazione di sequenziamento è stata preparata in un volume finale di 10 µl e conteneva:

- 2 µl di miscela di reazione costituita dall'enzima polimerasi, buffer, dNTPs e ddNTPs (Big Dye Mix);
- 3,2 pmol di un primer

- 10 ng di DNA
- H₂O deionizzata

Il sequenziamento ciclico comprende tre fasi come la PCR, le condizioni sono state:

- denaturazione iniziale a 96°C per 1'
 - denaturazione a 96°C per 10''
 - annealing a 50°C per 6''
 - estensione a 72°C per 4'
- } 25 cicli

I primers utilizzati durante il sequenziamento sono stati i seguenti:

Forward 5' tcacctcaacaacttgcacag 3'

Forward 5' ccgaggcgtagactagtgtt 3'

Forward 5' ggcgagagtgccgagga 3'

Forward 5' cacggcagagaactgt 3'

Reverse 5' ctgtcaatcacaggccacg 3'

Reverse 5' ccaccctggaactgcc 3'

Reverse 5' agaggaggcgagagtgta3'

Durante la denaturazione si ha l'apertura della doppia elica di DNA.

Durante l'annealing, l'unico primer presente nella reazione, si lega al filamento stampo di DNA per permettere alla DNA polimerasi di copiare la sequenza, in questo modo il prodotto della reazione si accumula con modalità lineare e non esponenziale come avviene nella PCR.

Durante l'estensione avviene l'aggiunta di nucleotidi al primer tramite l'incorporazione di dNTPs e ddNTPs, questi ultimi, privi del 3' OH, una volta incorporati, impediscono la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. Ciò provoca il blocco della reazione di polimerizzazione.

Questo metodo di sequenziamento si basa perciò sul principio di terminazione precoce del filamento (Metodo di Sanger). Le catene inizieranno in uno stesso punto (quello in cui si lega il primer) e termineranno in punti diversi perché, durante l'estensione, vengono incorporati sia i dNTPs che i ddNTPs marcati con quattro fluorocromi diversi.

Una volta avvenute le reazioni, queste sono state purificate meccanicamente con l'utilizzo dello strumento Biomek (Beckman Coulter). Di questi purificati, una piccola aliquota è stata successivamente esaminata sull'analizzatore genetico ABI Prism 3130, uno strumento multicolor basato sull'analisi fluorescente del DNA.

Qui, una luce laser incide sui frammenti analizzati, eccitando i fluorocromi legati ai nucleotidi che li compongono. L'emissione della fluorescenza da parte dei fluorocromi permette la lettura della sequenza, infatti, le quattro basi che compongono il DNA sono distinte perché ciascuna è marcata con un fluorocromo differente e quindi ha una lunghezza d'onda di emissione caratteristica che si traduce in un colore diverso per ogni distinta base azotata.

5.4 Studi di espressione

Per ottenere concentrazioni maggiori dei nostri DNA, abbiamo provveduto all'estrazione del DNA plasmidico su ampia scala (Maxiprep,) utilizzando il kit QIAGEN Plasmid Maxi (Qiagen). Per poter effettuare gli studi funzionali sul gene questi DNA sono stati transfettati. Col termine di transfezione si intende il processo attraverso il quale si ha il trasferimento di DNA esogeno all'interno di cellule eucariotiche.

Le nostre transfezioni erano transienti. In una transfezione transiente il DNA esogeno non si integra al genoma cellulare ma rimane nella cellula come frammento extracromosomico.

Sono state utilizzate due linee cellulari, entrambe di carcinoma ovarico umano; la prima sensibile al platino con sigla 2008, la seconda resistente al platino con sigla 2008/C13*.

Una linea cellulare resistente ad un farmaco viene selezionata attraverso una prolungata esposizione al farmaco per un prolungato periodo di tempo.

Questi procedimenti di selezione provocano numerosi cambiamenti intracellulari che contribuiscono ad aumentare la resistenza al cisplatino e includono, tra gli altri, una alterazione del trasporto e/o un ridotto accumulo del farmaco all'interno della cellula, un aumentato efflusso e meccanismi più efficienti di riparazione dai danni provocati dal farmaco sul DNA. In particolare è stato riscontrato, nella linea cellulare di carcinoma ovarico resistente al cisplatino (2008/C13*), che il potenziale della membrana mitocondriale è più alto rispetto a quello della linea parentale (2008) sensibile al farmaco e che tale differenza ha un ruolo nella resistenza al cDDP. Inoltre, studi di letteratura condotti sugli effetti di ioni bivalenti sull'apoptosi hanno mostrato che il Mg^{2+} ricopre un ruolo importante nella regolazione delle attività mitocondriali che partecipano ai processi apoptotici, tra cui la caduta del potenziale della membrana mitocondriale interna.

Le cellule sono state fatte crescere in terreno di coltura RPMI-1640 (Sigma), addizionato con 10% di siero fetale, penicillina 50 U/ml e streptomycin 50 μ g/ml, a 37°C in atmosfera arricchita con 5% di anidride carbonica.

Al raggiungimento della confluenza del 60%, le cellule sono state trasferite in piastre da 35 mm, lasciate incubare per una notte e transfettate utilizzando il liposoma DMRIE-C (Invitrogen), 2 μ g per ogni μ g di DNA.

Il liposoma, contenente lipidi policationici, con la sua carica positiva netta, si associa ai gruppi fosfato carichi negativamente del DNA.

Il complesso DNA-liposoma, grazie alla sua porzione lipidica, si fonde con la membrana cellulare e rilascia il suo contenuto nelle cellule.

Per la transfezione sono state preparate due soluzioni, una contenente il DNA con il terreno OPTIMEM (privo di siero e antibiotici) alla quale è stato aggiunto come controllo interno il pCMV-luc per valutare l'efficienza di transfezione, e l'altra contenente il liposoma e il terreno OPTIMEM. Queste

due sono poi state unite insieme e lasciate incubare per 45' per favorire l'interazione fra i componenti. Nel frattempo le piastre da 35 mm con all'interno le cellule sono state lavate con il terreno OPTIMEM in modo che questo, essendo privo di siero, eliminasse eventuali residui di siero dalle cellule che avrebbero potuto compromettere l'efficienza della transfezione. Al termine dei 45' di incubazione il preparato è stato addizionato alle cellule da transfettare e il tutto messo a incubare per 5h.

Dopo di che, eliminata dalle piastre la miscela contenente l'OPTIMEM, il DNA, il pCMV-luc e il liposoma, le cellule sono state fatte incubare per circa 15h a diverse condizioni:

basali, ovvero solo con terreno RPMI-1640, con RPMI-1640 a cui è stato aggiunto CuSO_4 in due diverse concentrazioni, 20 μM e 100 μM , e con RPMI-1640 a cui sono state aggiunte due differenti concentrazioni di cisplatino: 5 μM , e 50 μM . Le concentrazioni di cisplatino utilizzate tengono conto del 50% della concentrazione inibitoria (IC_{50}) che, nel caso della linea cellulare resistente al cisplatino (2008/C13*) è maggiore rispetto a quella della linea sensibile (2008). Alla fine delle 15h di incubazione le cellule sono state lavate col tampone salino PBS, raccolte, centrifugate e risospese in 80 μl di soluzione di lisi (Passive Lysis Buffer 1X). 20 μl di questi estratti sono stati testati per l'attività luciferasica nel lumenometro Lumat LB9501.

Tutti i valori di attività luciferasica sono stati normalizzati in base al contenuto proteico (utilizzando identiche quantità di ogni estratto proteico), e in base all'efficienza di transfezione saggiata tramite la misura dell'attività del reporter di controllo interno (pCMV-luc) contenente il gene reporter della luciferasi di lucciola distribuito in uguale quantità nelle varie transfezioni.

Per la valutazione dell'attività luciferasica è stato utilizzato il kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). L'attività luciferasica è stata espressa come percentuale del valore di luciferasi nelle cellule transfettate con DNA funzionalmente inerte, il vettore pRL-null. Nel saggio con il doppio reporter luciferasico, i valori sono espressi come rapporto dell'attività delle due luciferasi (di renilla e di lucciola) nei costrutti transattivanti, diviso per il rapporto di attività nel controllo (transattivato con

DNA inerte) reso uguale ad 1. In tal modo il valore uguale a 1 indica l'assenza di attività transattivante equamente ripartita tra i due promotori in esame.

6. Risultati

In questo studio abbiamo voluto indagare sul coinvolgimento del promoter del gene ATP7B nei casi di tumori resistenti al cisplatino nei quali è stata osservata una iperespressione della proteina ATP7B codificata. Per fare tutto ciò abbiamo creato 12 costrutti corrispondenti a 12 diversi aplotipi della suddetta regione (Tabella 6). Più precisamente, i costrutti 1, 2, 3, e 4 corrispondono a 4 aplotipi frequenti che complessivamente costituiscono il 96.26% dei cromosomi sia nella popolazione normale che in quella di pazienti con la malattia di Wilson. Il resto dei costrutti contengono degli aplotipi rari che sono il risultato della presenza di variazioni di sequenza rare su un background costituito dai 4 aplotipi frequenti. In particolare i costrutti 5, 6, e 7 contengono 3 aplotipi provenienti dalla presenza rispettivamente di una sostituzione -717 G>C, una inserzione -858insG ed una sostituzione -401C>G nel background dell'aplotipo 1. I costrutti 8, 9, e 10 contengono 3 aplotipi costituiti dal background dell'aplotipo 2 con inserite diverse variazioni di frequenza, precisamente, una doppia sostituzione -247 C>A e -404/-403 CG>TT per quanto riguarda l'aplotipo 8, la stessa sostituzione -247 C>A presente singolarmente per quanto riguarda l'aplotipo 9, ed una sostituzione -576 G>C per quanto riguarda l'aplotipo 10. Il costrutto 11 contiene un aplotipo proveniente dalla presenza di una sostituzione -224G>A nel background dell'aplotipo 3. Infine, il costrutto 12 contiene un aplotipo che deriva dalla presenza di una sostituzione -1064 G>A nel background dell'aplotipo 4.

Tali costrutti sono stati utilizzati per degli studi di transfezioni transienti utilizzando 2 linee cellulari, la 2008 e la 2008/C13*, provenienti da carcinoma ovarico. La linea 2008 è una linea cellulare sensibile mentre quella 2008/C13* è una linea cellulare resistente al trattamento sia con il cisplatino che con il rame. Studi precedenti hanno evidenziato che la proteina viene localizzata a livello esosomiale in entrambi le linee e viene espressa maggiormente nelle cellule resistenti rispetto a quanto non avvenga nelle cellule sensibili. Questi

dati quindi, suggeriscono che entrambe le linee dispongono di tutto il complesso proteine/fattori di trascrizione necessario per determinare le variazioni dell'espressione della proteina ATP7B e quindi eventualmente anche del suo promotore se sottoposto ad esperimenti di transfezioni nelle suddette linee.

In alcuni degli esperimenti sono stati utilizzati CuSO₄ o cisplatino in diverse concentrazioni. Queste concentrazioni sono già state utilizzate in precedenza in altri studi con le stesse linee cellulari 2008 e 2008/C13* allo scopo di meglio indagare sul coinvolgimento della proteina ATP7B nella resistenza al cisplatino. Si tratta perciò di concentrazioni di cui si è verificato il funzionamento in questi sistemi cellulari.

I risultati evidenziano una variazione nell'attività del promoter dei diversi costrutti a seconda dell'aplotipo, variazione spesso significativa nelle varie condizioni sperimentali:

-transfezioni con l'uso della linea cellulare 2008 in condizioni basali, dopo l'aggiunta di rame o di cisplatino (Figura 5, 6, dati non riportati).

-transfezioni con l'uso della linea cellulare 2008/C13* in condizioni basali, dopo l'aggiunta di rame o di cisplatino (Figura 7, 8, dati non riportati).

Per quanto riguarda le transfezioni dei vari costrutti con le cellule 2008, quando queste vengono indotte con 100 µM di CuSO₄, avviene una significativa diminuzione dell'attività del promoter rispetto alle condizioni basali. La diminuzione è particolarmente elevata nei costrutti 3, 5, 6, 8, 11, e 12 (Figura 9).

Quando le transfezioni vengono indotte con 20 µM di CuSO₄, l'attività del promoter risulta inferiore rispetto alle condizioni basali, ma tale inibizione è minore rispetto a quella provocata da 100 µM di CuSO₄ (Figura 9). Quando le transfezioni nelle cellule 2008 vengono indotte con 5 µM di cisplatino, si osserva una diminuzione dell'attività del promoter in tutti i costrutti, cosa che non avviene in condizioni basali (Figura 10). Tale inibizione è minore rispetto

alla quasi totalità di costrutti indotti con 100 μ M di CuSO₄, e rispetto a quasi la metà di quelli indotti con 20 μ M di CuSO₄ (Figura 11).

Per quanto riguarda le transfezioni dei vari costrutti nelle cellule 2008/C13*, quando queste vengono indotte con 100 μ M di CuSO₄, si osserva una diminuzione dell'attività del promoter fortemente significativa in tutti i casi (Figura 12). Questa è particolarmente elevata nei costrutti 3, 6, e 12. Quando invece queste transfezioni vengono indotte con 20 μ M di CuSO₄, avviene un grande aumento dell'attività del promoter, un aumento che possiamo definire fortemente significativo rispetto ai costrutti espressi in condizioni basali.

Quando le transfezioni dei costrutti nelle cellule 2008/C13* vengono indotte con 50 μ M di cisplatino, si osserva una diminuzione dell'attività del promoter in tutti i costrutti, diminuzione che in diversi casi è significativa.

Quando invece le transfezioni vengono indotte con 5 μ M di cisplatino, in tutti i costrutti si osserva un aumento dell'attività del promoter fortemente significativo rispetto ai costrutti espressi in condizioni basali (Figura 13). Tale aumento è paragonabile a quello ottenuto quando le transfezioni sono state indotte con 20 μ M di CuSO₄, anche se superiore a quest'ultimo nella maggioranza dei casi (Figura 14).

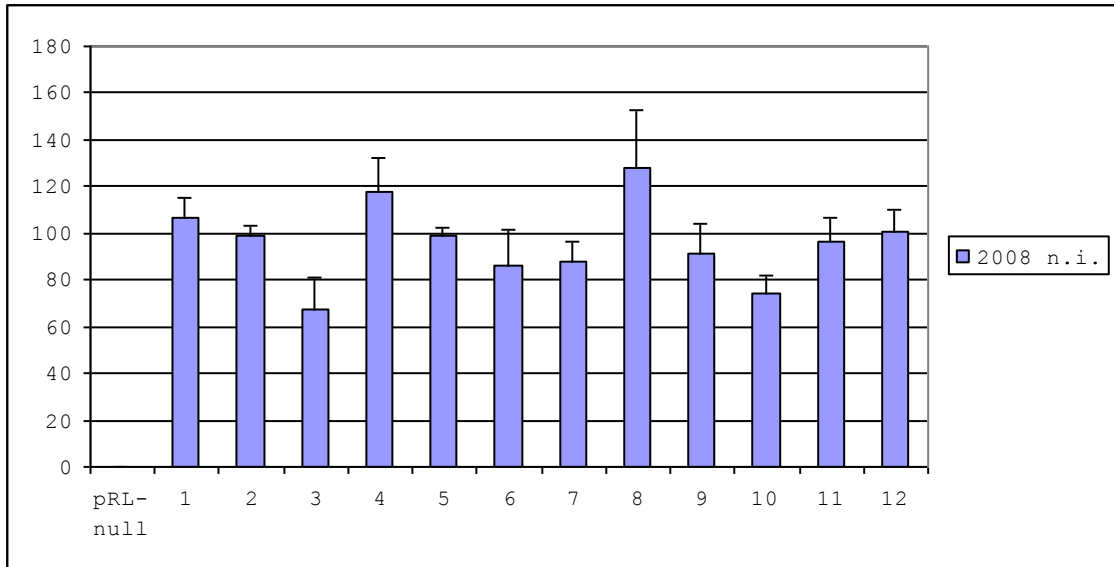


Figura 5. Attività luciferasica relativa alla regione promotrice del gene ATP7B in costrutti con diversi aplotipi transfettati in condizioni basali nella linea cellulare di carcinoma ovarico sensibile al cisplatino (2008).

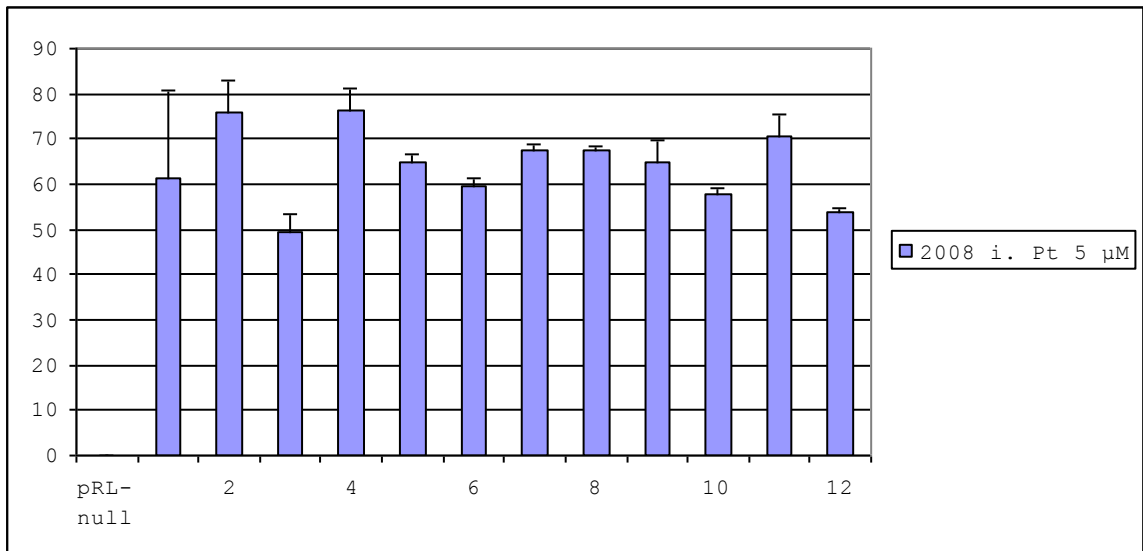


Figura 6. Attività luciferasica relativa alla regione promotrice del gene ATP7B in costrutti con diversi aplotipi transfettati nella linea cellulare di carcinoma ovarico sensibile al cisplatino (2008) con induzione di cisplatino 5 µM.

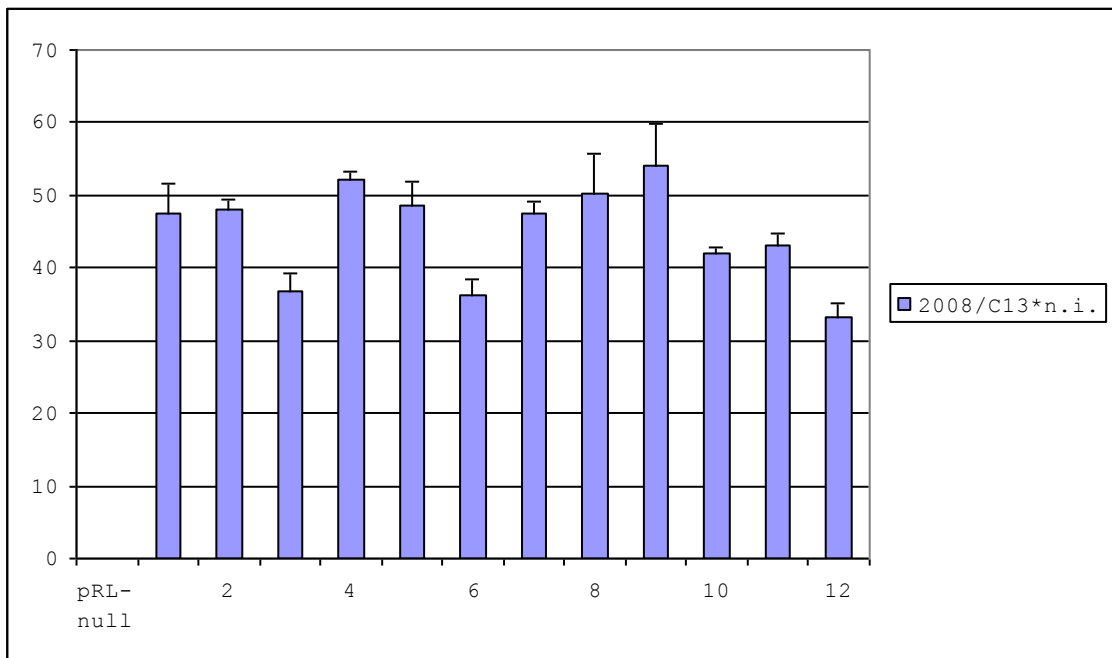


Figura 7. Attività luciferasica relativa alla regione promotrice del gene ATP7B in costrutti con diversi aplotipi transfettati in condizioni basali nella linea cellulare di carcinoma ovarico resistente al cisplatino (2008/C13*).

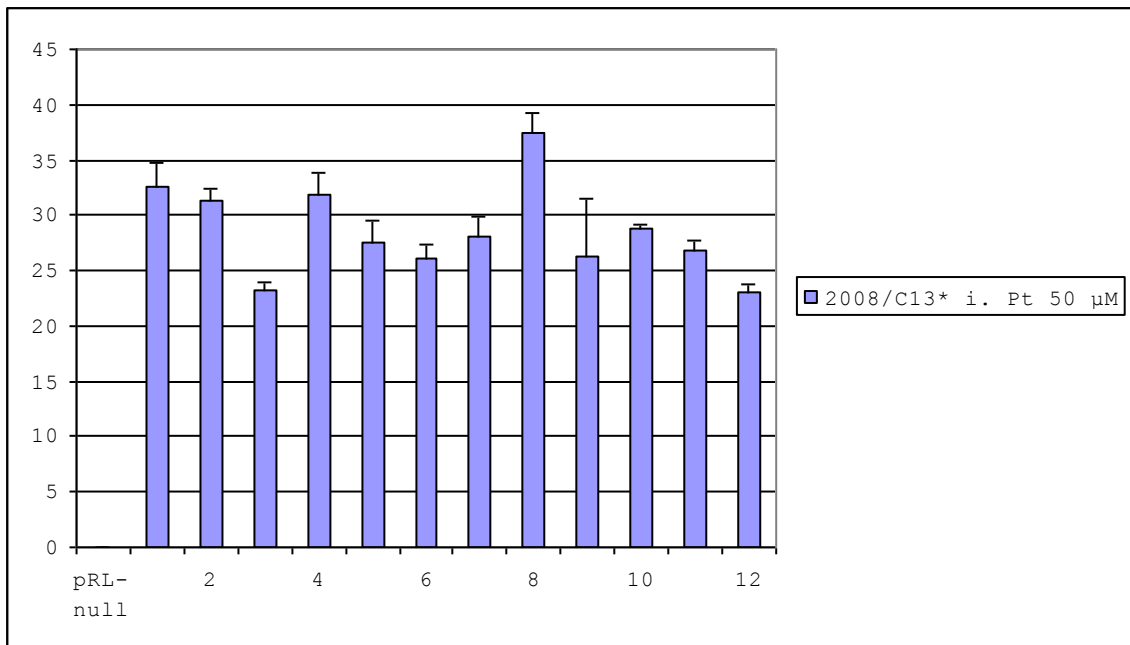


Figura 8. Attività luciferasica relativa alla regione promotrice del gene ATP7B in costrutti con diversi aplotipi transfettati nella linea cellulare di carcinoma ovarico resistente al cisplatino (2008/C13*) con induzione di cisplatino 50 μM.

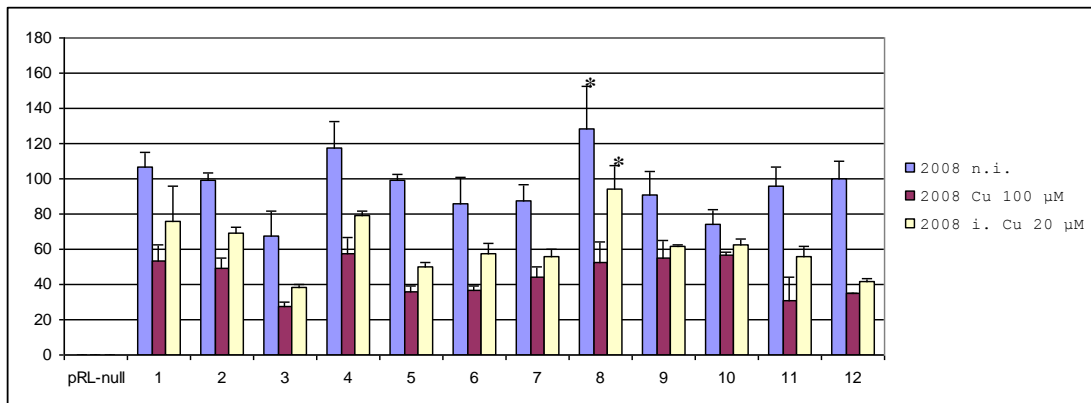


Figura 9. Attività luciferasica dei costrutti in studio transfettati nella linea cellulare 2008 in: condizioni basali (n.i.); induzione con rame 100 µM (i. Cu 100 µM); induzione con rame 20 µM (i. Cu 20 µM); *p<0,05; **p<0,005; *p<0,0005; ****p<0.00005**

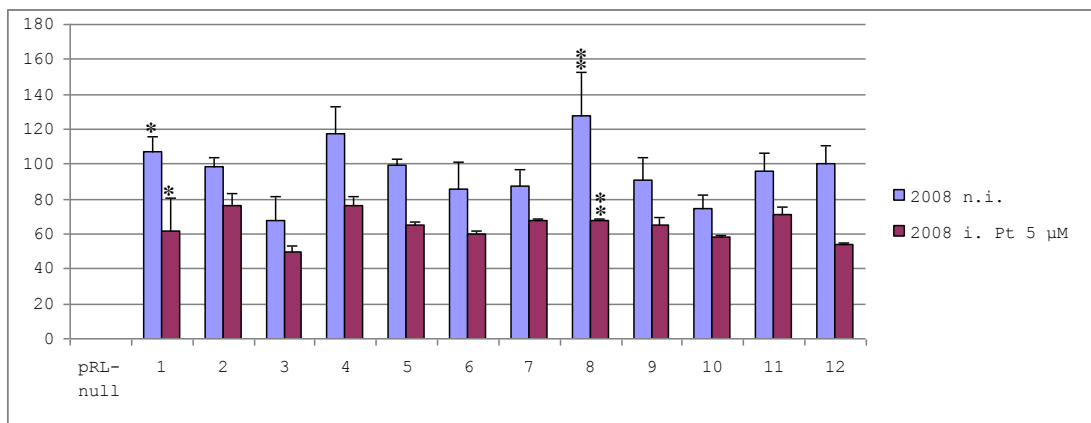


Figura 10. Attività luciferasica dei costrutti in studio transfettati nella linea cellulare 2008 in: condizioni basali (n.i.); induzione con cisplatino 5 µM (i. Pt 5 µM) *p<0,05; **p<0,005; *p<0,0005; ****p<0.00005**

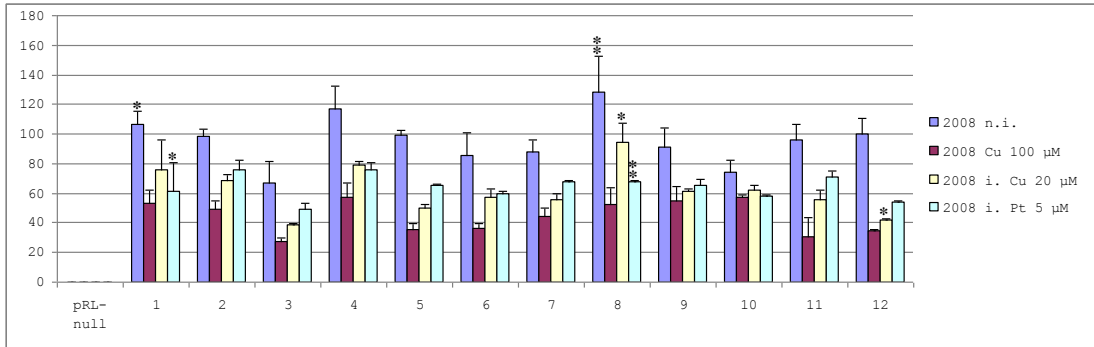


Figura 11. Attività luciferasica dei costrutti in studio transfettati nella linea cellulare 2008 in: condizioni basali (n.i.); induzione con rame 100 μM (i. Cu 100 μM); induzione con rame 20 μM (i. Cu 20 μM); induzione con cisplatino 5 μM (i. Pt 5 μM) *p<0,05; **p<0,005; *p<0,0005; ****p<0.00005**

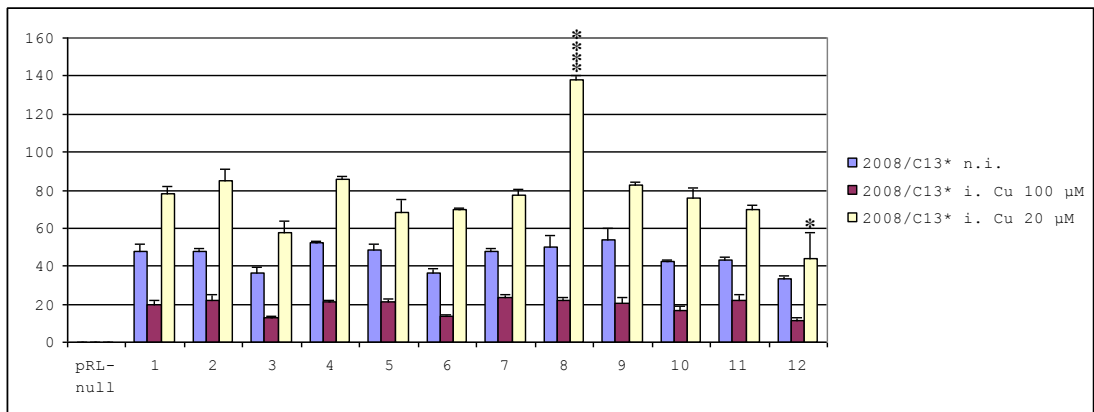


Figura 12. Attività luciferasica dei costrutti in studio transfettati nella linea cellulare 2008/C13* in: condizioni basali (n.i.); induzione con rame 100 μM (i. Cu 100 μM); induzione con rame 20 μM (i. Cu 20 μM) *p<0,05; **p<0,005; *p<0,0005; ****p<0.00005**

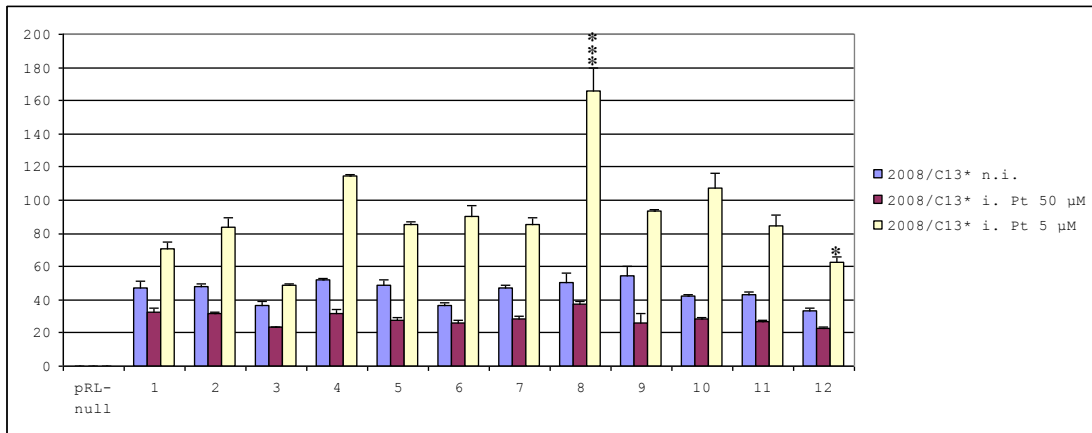


Figura 13. Attività luciferasica dei costrutti in studio transfettati nella linea cellulare 2008/C13* in: condizioni basali (n.i); induzione con cisplatino 50 µM (i. Pt 50 µM); induzione con cisplatino 5 µM (i. Pt 5 µM)
 *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005; ****p<0.00005

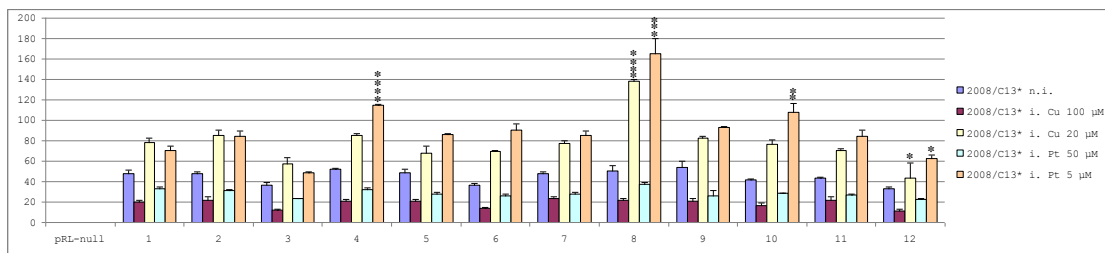


Figura 14. Attività luciferasica dei costrutti in studio transfettati nella linea cellulare 2008/C13* in: condizioni basali (n.i.); induzione con rame 100 µM (i. Cu 100 µM); induzione con rame 20 µM (i. Cu 20 µM); induzione con cisplatino 50 µM (i. Pt 50 µM); induzione con cisplatino 5 µM (i. Pt 5 µM)
 *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,0005; ****p<0.00005

7. Discussione

Negli ultimi anni diversi dati pubblicati in letteratura hanno suggerito che la proteina ATP7B, il cui difetto congenito nel metabolismo del rame causa la malattia di Wilson, è implicata anche nella resistenza al cisplatino ed ai suoi analoghi oxaliplatino e carboplatino in diversi tipi di tumori solidi, in particolare in quelli dell'ovaio. Diversi studi sperimentali in vitro hanno evidenziato che linee cellulari di carcinoma ovarico (A2780, 2008, IGROV-1), presentavano una diversa resistenza al trattamento con il cisplatino rispetto alle loro versioni resistenti (A2780/CP, 2008/C13*, IGROV-1/CP) e che l'aumento di resistenza di queste ultime era associato ad una iperespressione della proteina ATP7B (74). Inoltre, lo stesso comportamento veniva osservato in parallelo quando queste linee cellulari venivano esposte ad alte concentrazioni di rame. Come conseguenza, diversi studi hanno evidenziato che le tre linee cellulari resistenti (A2780/CP, 2008/C13*5.25, IGROV-1/CP) presentavano un più alto indice di sopravvivenza, un minor accumulo di rame nel citoplasma ed una maggiore eliminazione del cisplatino e del rame rispetto alle loro corrispondenti linee cellulari sensibili A2780, 2008 e IGROV-1 esposte anch'esse a questi metalli. Nessun studio ad oggi ha mai preso in considerazione quali potessero essere le determinanti genetiche alla base di questo comportamento.

Che la regione del promoter abbia un ruolo nella regolazione dell'espressione di tutti i sistemi genici è un dato acquisito da una miriade di lavori pubblicati da diversi anni. E' ormai noto che, alterazioni nella regione promoter possono risultare in alterazioni nell'espressione del gene e quindi della proteina interessata, con conseguenze che possono essere le più varie. Per esempio, una delezione nella regione 5' UTR del gene ATP7B identificata molti anni fa dal nostro gruppo, costituisce la mutazione più frequente nella popolazione sarda in quanto diminuisce l'attività del promoter del 75% rispetto al controllo normale. Allo scopo di indagare le basi molecolari della resistenza al cisplatino, abbiamo voluto studiare la regione promoter del gene ATP7B

come regione candidata ad alterare la sua espressione in condizioni di eccesso di rame o di cisplatino e in grado quindi di conferire resistenza a questi agenti chimici.

In questo studio abbiamo preso in considerazione il coinvolgimento del promoter ATP7B nella resistenza al cisplatino nel caso del tumore ovarico. A questo scopo abbiamo eseguito studi funzionali di diversi promotori isolati nella popolazione normale ed in pazienti con la malattia di Wilson. Gli studi sono stati eseguiti attraverso transfezioni transienti di due linee cellulari di carcinoma ovarico, la 2008, considerata sensibile al trattamento con il cisplatino e la 2008/C13*, sua versione resistente al trattamento con il cisplatino.

I risultati ottenuti ci permettono di formulare alcune considerazioni.

La prima ci permette di dire che, il modello delle transfezioni delle cellule 2008 e 2008/C13* e lo studio dell'attività luciferasica dei vari promotori è valido in quanto, come riportato nelle figure 5, 6, 7 e 8, l'attività del promoter varia a seconda dell'aplotipo in studio, sia negli esperimenti con le cellule 2008 che con le cellule 2008/C13*. Inoltre, la variabilità nell'attività del promoter si osserva anche durante l'esposizione a diverse concentrazioni di CuSO₄ o di cisplatino. A questo dato possiamo anche aggiungere che le linee cellulari in studio contengono e dispongono del complesso proteine/fattori di trascrizione necessarie per la funzionalità del promoter del gene ATP7B. Studi precedenti hanno evidenziato che la proteina ATP7B è localizzata negli esosomi all'interno delle linee cellulari 2008 e 2008/C13* (75), dove l'espressione di questa proteina risulta essere di 2.6 volte più alta nelle cellule resistenti 2008/C13* rispetto a quelle sensibili 2008. Inoltre, gli stessi studi hanno evidenziato che la quantità di rame sequestrato negli esosomi delle cellule 2008/C13* è 2.6 volte maggiore rispetto a quella sequestrata dalle cellule 2008. Gli esosomi fanno parte dei corpi multivescicolari (MVBs) e costituiscono parte integrale del sistema endosomiale coinvolto nel trasporto, nel riciclaggio e nella degradazione di varie molecole. Inoltre servono come mezzo alternativo per l'eliminazione di

proteine e molecole quando la degradazione di queste ad opera dei lisosomi viene meno. Disponiamo quindi di un modello valido per i nostri esperimenti, sia per quanto riguarda i costrutti in studio che per quanto riguarda le linee cellulari usate. In questo contesto, la presenza di una certa variabilità nell'attività dei promoter dei diversi costrutti nelle varie condizioni, suggerisce che il promoter del gene ATP7B può contribuire alla variazione dell'espressione del gene e della proteina ATP7B nei casi di tumore ovarico, sia in condizioni basali che durante l'esposizione al rame o al cisplatino. Nella figura 9 sono riportati i risultati delle transfezioni dei costrutti nelle cellule sensibili 2008 eseguite in condizioni basali e dopo l'induzione con 100 μ M e 20 μ M di CuSO₄. Risulta evidente che l'attività del promoter nelle cellule sensibili 2008 viene inibita in tutti i costrutti, sia quando vengono esposti a 100 μ M di CuSO₄ che quando vengono esposti a 20 μ M di CuSO₄. La quantità di rame usata negli esperimenti di questo studio può essere considerata alta per quanto riguarda i 100 μ M di CuSO₄ e relativamente bassa per quanto riguarda i 20 μ M di CuSO₄. Questo, sulla base di precedenti studi funzionali eseguiti sul ruolo della proteina ATP7B nelle stesse linee cellulari per un tempo di esposizione di 15 ore, lo stesso utilizzato nei nostri esperimenti (23, 74), ci ha permesso di eseguire i nostri esperimenti in sicurezza, evitando la morte delle linee cellulari in studio. Sempre in riferimento alla figura 9, nei costrutti 3, 5, 6, 11, e 12, l'inibizione al rame sembra essere particolarmente accentuata. Inoltre, l'inibizione sembra essere dose dipendente in quanto è più alta ad elevate dosi di rame di quanto non lo sia a dosi relativamente basse. Quindi possiamo affermare che, il promoter del gene ATP7B viene inibito dall'accumulo di rame all'interno delle cellule sensibili 2008 e che, il grado di inibizione varia a seconda della composizione (aplotipo) del promoter e della concentrazione del rame all'interno della cellula. Questo potrebbe essere il meccanismo alla base della bassa resistenza (sensibilità) che caratterizza le linee cellulari 2008 quando vengono esposte al rame. Un'altra variante che probabilmente condiziona il comportamento del promoter potrebbe essere il tempo di esposizione, questo dovrebbe essere l'oggetto di studi successivi.

La spiegazione sull'azione inibitoria del rame nei riguardi del promoter nelle cellule 2008 non è chiaro ma possiamo tentare qualche ipotesi. E' noto da diversi studi che uno dei fattori inibitori di un promoter è la presenza di radicali liberi all'interno della cellula, i quali possono inibire il promoter indebolendo il legame del fattore di trascrizione Sp1 (76). E' possibile che nelle nostre transfezioni l'esposizione al rame abbia creato, nelle linee cellulari 2008, dei radicali liberi altamente reattivi con conseguente inibizione dei vari promoter analizzati nei nostri esperimenti. Questo significa che, probabilmente, in queste linee cellulari sono venuti meno fattori protettivi come l'azione di proteine simili alla metallotionina che in altri sistemi cellulari proteggono appunto dalla formazione di radicali liberi. Infatti, in studi precedenti abbiamo eseguito transfezioni in linee cellulari HepG2 con gli stessi costrutti ed in tutti i casi, con l'aggiunta di 100 μ M, abbiamo ottenuto un aumento dell'attività del promoter (nostri dati non pubblicati). Una seconda ipotesi è che, nelle cellule 2008, vengano a mancare o ad essere insufficientemente sintetizzate le proteine prodotte sotto il controllo dei metal response elements (MREs) che regolano l'attività dei promoter delle metalloproteine in risposta alla presenza di metalli come il rame nel nostro caso.

Quando le transfezioni nelle cellule 2008 vengono indotte con 5 μ M di cisplatino si osserva una significativa diminuzione dell'attività del promoter in tutti i costrutti rispetto alle condizioni basali (Figura 10). Tale inibizione è minore rispetto alla quasi totalità di costrutti indotti con 100 μ M di CuSO₄, e rispetto a quasi la metà di quelli indotti con 20 μ M di CuSO₄ (Figura 11). Si tratta di un dato che indica che il cisplatino ha sull'attività del promoter del gene ATP7B un'azione analoga a quella del rame, con meccanismi che potrebbero essere identici. Inoltre, indica che la sensibilità al cisplatino nelle cellule 2008 potrebbe essere determinata dall'inibizione del promoter, condizione che avrebbe come conseguenza una bassa produzione di proteina ATP7B, con insufficiente protezione contro l'accumulo di questo metallo. I nostri esperimenti sono stati eseguiti esponendo le transfezioni nella linea cellulare 2008 solamente a 5 μ M di cisplatino, per cui non

possiamo affermare che il grado di inibizione sia dose dipendente, questo sarà valutato in esperimenti futuri. Inoltre, bisognerebbe indagare se gli effetti del cisplatino possano essere modulati in relazione al tempo di esposizione.

Le transfezioni dei costrutti nelle cellule 2008/C13* hanno prodotto risultati altrettanto interessanti in tutte le condizioni sperimentali. Infatti, quando queste vengono indotte con 100 μM di CuSO_4 , si osserva una diminuzione dell'attività del promoter fortemente significativa in tutti i casi (Figura 12); questa diminuzione è particolarmente accentuata nei costrutti 3, 6, e 12. Invece, quando queste cellule vengono indotte con 20 μM di CuSO_4 , si verifica un grande aumento dell'attività del promoter, superiore in modo fortemente significativo anche all'espressione dei costrutti in condizioni basali. Si osserva quindi un capovolgimento dell'attività del promoter a concentrazioni relativamente basse di rame rispetto a quello che avviene invece ad alte concentrazioni di rame. Questo indica che l'attività varia nei diversi costrutti, che è dose dipendente e che contrariamente a quanto avviene nelle cellule sensibili, dove alle stesse concentrazioni di rame l'attività dei promoter è sempre significativamente inibita, nelle cellule resistenti si ha un'esaltazione dell'attività del promoter quando le concentrazioni di CuSO_4 non sono molto alte, probabilmente come reazione protettiva all'accumulo di questo metallo.

Quando le transfezioni nelle cellule 2008/C13* sono esposte a due diverse concentrazioni di cisplatino, una alta di 50 μM ed una bassa di 5 μM (Figura 13), notiamo un comportamento dei vari promoter analogo a quanto avviene durante l'esposizione al CuSO_4 (Figura 12). In altre parole 50 μM di cisplatino provocano un'inibizione dell'attività del promoter mentre 5 μM inducono un'attività eccezionalmente alta. Quindi va sottolineata l'analogia che distingue l'attività dei costrutti all'esposizione al CuSO_4 e al cisplatino. Si tratta di un comportamento in linea con quanto viene riportato in letteratura, secondo cui, nelle cellule di alcuni tumori resistenti al platino è presente anche una resistenza al rame ed entrambe sono associate ad una

iperespressione della proteina ATP7B (77). Messi insieme, questi dati suggeriscono che l'iperespressione osservata in questi casi potrebbe essere determinata anche grazie al contributo dell'azione del promoter del gene ATP7B. Inoltre, sembra che il promoter ATP7B sia più sensibile alla presenza del cisplatino di quanto non lo sia a quella del CuSO₄ in quanto, l'esposizione a 5 µM di cisplatino induce una maggiore attività di quanto non faccia l'esposizione a 20 µM di rame (Figura 14).

Quindi nelle cellule resistenti sono presenti e disponibili tutti quei fattori/proteine che contribuiscono all'aumento dell'attività del promoter in condizioni di eccesso di rame o di cisplatino che a loro volta vengono meno quando la concentrazione di rame aumenta in modo eccessivo, tanto da portare ad una inibizione dell'attività del promoter. Questo comportamento dell'attività dei vari promoter deve essere il risultato di diversi fattori che all'interno delle cellule agiscono in sinergia, determinando le varie risposte all'esposizione al rame o al cisplatino. Sulla base dei risultati ottenuti (Figura 14) possiamo dire che, sicuramente uno di questi fattori è il promoter stesso analizzato in ogni singolo esperimento e più precisamente il promoter caratterizzato da un particolare aplotipo, in quanto, nonostante tutti i costrutti siano iperespressi nelle cellule resistenti, il grado di espressione varia tra i costrutti in relazione agli specifici aplotipi presenti. Quindi, all'interno delle cellule resistenti 2008/C13*, il promoter del gene ATP7B interagisce con dei fattori che esaltano la sua attività in modo variabile e che probabilmente sono gli stessi che contribuiscono all'aumento dell'espressione della proteina ATP7B endogena e che invece vengono a mancare nelle cellule sensibili 2008. Tali fattori potrebbero far parte dei sistemi di difesa antiossidanti, come le metallothioneine o la glutathione sintetasi che all'interno delle 2008/C13* proteggono contro la formazione di radicali liberi. Come conseguenza creano le condizioni per l'azione di altri fattori di trascrizione con un'azione che è specifica nelle cellule 2008/C13* (78). Alternativamente, possiamo supporre che i suddetti fattori siano comuni a entrambe le cellule sensibili e resistenti e che l'intensità della loro azione sia relativa alla presenza dei radicali liberi che

come è noto hanno un ruolo inibitorio (76). Il costrutto 8 (Figura 12) presenta eccezionalmente un'alta espressione quando viene esposto a 20 μ M di CuSO₄. L'aplotipo contenuto in questo costrutto è raro e si forma sul background dell'aplotipo contenuto nel costrutto 2, un'aplotipo frequente (56%) dove probabilmente successivamente sono avvenuti due eventi mutazionali, una sostituzione -247 C>A ed una doppia sostituzione -404/-403 CG>TT. E' interessante notare che il costrutto 8 contiene un aplotipo che si differenzia dal costrutto 9 per il fatto che quest'ultimo presenta solo la sostituzione -247 C>A ma non la -404/-403 CG>TT (Tabella 6). Questo dato suggerisce che, la combinazione della -247 C>A con la -404/-403 CG>TT, costituisce l'elemento chiave nella iperespressione del costrutto 8 quando esso viene esposto a concentrazioni non particolarmente inibitorie di CuSO₄ e di cisplatino in quanto, entrambi i costrutti, quello originale 2 e quello 9 mostrano, quando esposti a 20 μ M di CuSO₄, un comportamento simile fra loro ma molto diverso da quello del costrutto 8 (Figura 14).

Se vogliamo tentare di tradurre, anche se in modo approssimativo, questi dati in considerazioni cliniche, possiamo affermare che i nostri risultati suggeriscono che il promoter del gene ATP7B è coinvolto nella resistenza al cisplatino nel carcinoma ovarico e che la resistenza viene modulata dalla presenza di aplotipi specifici nella regione promoter. Infatti, se osserviamo i costrutti 1, 2, 3, e 4 nella figura 13, che corrispondono agli aplotipi più frequenti presenti nel 97% nella popolazione generale, vediamo che l'aplotipo 4 all'esposizione con cisplatino 5 μ M mostra una attività significativamente maggiore, quindi potrebbe essere l'aplotipo candidato ad indurre la resistenza in sinergia con altre determinanti proteiche espresse nelle cellule resistenti. Quindi intendiamo dire che tra tutti gli aplotipi che comunque sono iperespressi nelle cellule resistenti solo alcuni con un'attività particolarmente alta potrebbero indurre la resistenza.

E' importante ribadire che, questo studio non fornisce una risposta definitiva sul ruolo del promoter del gene ATP7B nella resistenza al platino, ma una evidenza indiretta molto forte che tutto questo possa realmente accadere, e comunque per la prima volta pone in modo concreto la questione del ruolo delle determinanti genetiche alla base della resistenza al cisplatino. Inoltre allarga il campo alla possibilità di nuovi studi, includendo come nuova variante di cui tener conto, la regione promoter del gene ATP7B.

Per quanto riguarda il nostro lavoro, è da sottolineare come possa costituire la premessa per ulteriori studi per meglio definire i nostri risultati. Questi includeranno:

-Nuovi esperimenti di transfezioni nelle cellule 2008 ed 2008/C13* usando diverse concentrazioni di rame e cisplatino per meglio definire le quantità al di sopra o al di sotto delle quali avviene l'inibizione del promoter nei vari costrutti in entrambe le linee cellulari. Gli esperimenti verranno eseguiti non solo tenendo conto delle diverse concentrazioni ma anche dei diversi tempi di esposizione all'agente chimico. In seguito le transfezioni saranno eseguite con l'utilizzo di altre linee cellulari sensibili e resistenti provenienti da altri tumori come il carcinoma gastrico, l'epatocarcinoma, il carcinoma esofageo, il carcinoma del colon, il carcinoma orale a cellule squamose, il carcinoma uterino, per i quali è stata riportata la presenza di resistenza al cisplatino associata all'iperespressione della proteina ATP7B (78). Tutti i suddetti studi verranno eseguiti esponendo le transfezioni anche agli analoghi del cisplatino, come il carboplatino ed oxaliplatino, i quali sono efficienti in alcuni tumori resistenti al cisplatino e per i quali è stata riferita la resistenza in altri tipi di tumori. Sarà interessante capire se, ed in che modo, è coinvolto il promoter del gene ATP7B.

-Studi funzionali mai eseguiti prima, con costrutti che includeranno sia il promoter che il cDNA del gene ATP7B.

-Studi clinici di associazione tra determinati aplotipi del promoter ATP7B e la resistenza al cisplatino nei tumori nei quali questa è stata già descritta. Nel caso venisse confermata una tale associazione, questo avrebbe delle conseguenze importanti sia dal punto di vista terapeutico, in quanto darebbe enormi informazioni per lo sviluppo di nuovi farmaci e per il superamento della loro resistenza, sia dal punto di vista della strategia terapeutica, in quanto permetterebbe di attuare diverse combinazioni terapeutiche in pazienti trattati con farmaci a base di platino con enorme risparmio di tempo a vantaggio del paziente.

8. Bibliografia

1. International Human Genome Sequencing Consortium: "*Initial sequencing and analysis of the human genome*" Nature 409 (2001) 860-921.
2. J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt et al.: "*The sequence of the human genome*" Science 291 (2001) 1304-1351.
3. E.S. Lander: "*The new genomics: Global views of biology*" Science 274 (1996) 536-539.
4. L. Peltonen, V.A. McKusick: "*Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era*" Science 291 (2001) 1224-1229.
5. N. Risch: "*Searching for genetic determinants in the new millennium*" Nature 405 (2000) 847-856.
6. P.R. Buckland: "*The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanism of action*" Biochimica et Biophysica Acta 1762 (2006) 17-28.
7. A.J. Brooks: "*The essence of SNPs*" Gene 234 (1999) 177-186.
8. K. Byoung-Chul, K. Woo-Yeon, P. Daeiu, C. Won-Hyong, S. Kwangsik, B. Jong: "*SNP@Promoter: a database of human SNPs*"

(Single Nucleotide Polymorphisms) within the putative promoter regions” BMC Bioinformatics 9 Suppl.I(2008).

9. D.A. Kleinjan, V. van Heyningen: *“Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease”* Am. J. Genet. 76 (2005) 8-32.
10. S.L. Coleman, P.R. Buckland, B. Hoogendoorn, C.A. Guy, K. Smith, M.C. O'Donovan: *“Experimental analysis of the annotation of promoter in the public database”* Hum. Mol. Genet. 11 (2002) 1817-1821.
11. N.I. Gershenzon, I.P. Ioshikhes: *“Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis”* Bioinformatics 21 (2005) 1295-1300.
12. A. Kanhere, M. Bansal: *“Structural properties of promoters: similarities and difference between prokaryotes and eukaryotes”* Nucleic Acids Res. 33 (2005) 3165-3175.
13. R.E. Dickerson: *“DNA bending: the prevalence of kinkiness and the virtues of normality”* Nucleic Acids Res. 26 (1998) 1906-1926.
14. E.D. Ross, P.R. Hardwidge, L.J. Mahaer III: *“HMG proteins and DNA flexibility in transcription activation”* Mol. Cell. Biol. 21 (2001) 6598-6605.
15. J. Kim, S. Klooster, D.J. Shapiro: *“Intrinsically bent DNA in a eukaryotic transcription factor recognition sequence potentiates transcription activation”* J. Biol. Chem. 270 (1995) 1282-1288.

16. L. Tsai, L. Luo, Z. Sun: "Sequence-dependent flexibility in promoter sequences" *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20 (2002) 127-134.
17. D. Nègre, C. Bonod-Bidaud, C. Oudot, J.F. Prost, A. Kolb, A. Ishihama, A.J. Cozzone, J.C. Cortay: "DNA flexibility of the UP element is a major determinant for transcriptional activation at the *Escherichia Coli acetate promoter*" *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 713-718.
18. A.K. Nagaich, E. Appella, R.E. Harrington: "DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor suppressor protein p53" *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 14842-14849.
19. S.L. Coleman, P.R. Buckland, B. Hoogendoorn, C.A. Guy, K. Smith, M.C. O'Donovan: "A streamlined approach to functional analysis of promoter region polymorphisms" *Bio Techniques* 33 (2002) 412-418.
20. R. Safaei: "Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs" *Cancer Letters* XX (2005) 1-6.
21. G. Samini, R. Safaei, K. Datano, A.K. Holzer, M. Rochdi, M. Tomioka, et al.: "Increased expression of the copper efflux transporter ATP7B mediates resistance to cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in ovarian cancer cells" *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 4661-4669.
22. K. Katano, R. Safaei, G. Samini, A. K. Holzer, M. Tomioka, M. Goodman, et al.: "Confocal microscopic analysis of the interaction between cisplatin and the copper transporter ATP7B in human ovarian carcinoma cells" *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 4661-4669.

23. M. Komatsu, T. Sumizawa, M. Mutoh, Z. S. Chen, K. Tarada, T. Furukawa, et al.: *“Copper transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance”* Cancer Research 60, 1313-1316.
24. M. Ohbu, K. Ogawa, S. Konno, A. Kanzaki, K. Terada, T. Sugiyama, et al.: *“Copper transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma”* Cancer Letters 139, 33-38.
25. B. Rosenberg: *“Platinum complexes for the treatment of cancer: why the search goes on”* in: B. Lippert (Ed): *“Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug”* Wiley-VHC, Basel, Switzerland (1999) 3-27.
26. L. R. Kelland: *“New platinum antitumor complexes”* Crit. Rev. Oncol./Hematol. 15 (1993) 191-219.
27. K. R. Barnes, S. J. Lippard: *“Cisplatin and related anticancer drugs: recent advances and insights”* Met. Ions. Biol. Syst. 42 (2004) 143-177.
28. K. Nakayama et al.: *“Copper transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP, and BCRP”* Int. J. Cancer 101 (2002) 488-495.
29. A. Eastman: *“Crosslinking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes”* Chem. Biol. Interact. 61 (1987) 241-248.

30. G. M. Lai, R. F. Ozols, R. C. Young, T. C. Hamilton: *Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines* J. Nat. Cancer Inst. 81 (1989) 535-539.
31. B. C. McKay, M. Ljungam, A. J. Rainbow, *Potential roles for p53 in nucleotide excision repair* Carcinogenesis 20 (1999) 1389-1396.
32. R. Safaei, S. B. Howell: *Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs* Crit. Rev. Oncol. Hematol. 53 (2005) 13-23.
33. S. B. Howell, R. Safaei, C. A. Larson, M. J. Sailor: *Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs* Mol. Pharmacol. 77 (2010) 887-894.
34. K. Katano, R. Safaei, G. Samini, A. K. Holzer, M. Rochdi, S. B. Howell: *The copper export ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells* Mol. Pharmacol. 64 (2003) 466-473.
35. A. K. Holzer, G. Samini, K. Katano, W. Naerdemann, X. Lin, R. Safaei, S. B. Howell: *The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells* Mol. Pharmacol. 66 (2004) 817-823.
36. M. T. Kuo, H. H. W. Chen, I. S. Song, N. Savaraj, T. Ishikawa: *The roles of copper transporters in cisplatin resistance* Cancer Metastasis Rev. 26 (2007) 71-83.

37. A.G Bearn: *"Genetic analysis of the 30 families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration)"* Ann. Hum. Genet. 24 (1960) 33-43.
38. S.A.K. Wilson: *"Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver"* Brain 34 (1912) 295-509.
39. D.M Danks: *"Disorders of copper transport"* In: A.L. Beaudet, W.S Sly, D. Valle, editors. *Metabolic basis of inherited disease*, New York: McGraw-Hill (1989) 1416-1422.
40. R.E Tanzi, K. Petrukhin, I. Chernov, et al: *"The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene"* Nature Genet. 5 (1993) 344-350.
41. I.H Scheinberg, I. Sternlieb: *Wilson's Disease*. In: H. Lloyd, J. Smith editors. *"Major problems in internal medicine"* vol.23. Philadelphia: W.B. Saunders (1984) 10-12.
42. A. Zappu, O. Magli, M.B. Lepori, V. Dessì, S.Diana, S. Incollu, E. Kanavakis, P. Nicolaidou, N. Manolaki, A. Fretzayas, S. De Virgilis, A. Cao, G. Loudianos: *"High incidence and allelic homogeneity of Wilson Disease in 2 isolated populations: a prerequisite for efficient disease prevention programs"* J. of Ped. Gastr. And Nut. 47 (2008) 334-338.
43. Pena MM, Lee J, Yhiele DJ: *"A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution"* J Nutr 129 (1999) 1251-1260.

44. S. Tanner: "*Disorders of copper metabolism in disease of the liver and biliary system in children*" Kelly, Blackwell Science, editors (1999) 167-185.
45. R.J. Sokol: "Antioxidant defenses in metal-induced liver damage" *Semin Liver Dis* 16 (1996) 39-46 .
46. T.Y Tao, J.D. Gitlin: "*Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease*" *Hepatology* 37 (2003) 1241-1247.
47. N.E Hellman, J.D. Gitlin: "*Ceruloplasmin metabolism and function*" *Ann. Rev. Nutr.* 22 (2002) 439-458.
48. M. Schaefer, J.D. Gitlin: "*Genetic disorder of membrane transport. Wilson's disease and Menkes disease*" *Am J Physiol* 276 (1999) G311-G314.
49. A. Gupta, S. Lutsenko: "*Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential*" *Future Med Chem.* 6 (2009) 1125-1142.
50. S. Lutsenko, M.J. Petris: "*Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPase: insights from biochemical and cell biological approaches*" *J. Membr. Biol.* 191 (2003) 1-12.
51. I.H. Hung, M. Suzuki, Y. Yamaguchi, D.S Yuan, R.D. Klausner, J.D. Gitlin: "*Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae**" *J Biol Chem* 272 (1997) 21461-21466.

52. J. Lee, M. J. Petris, D. J. Thiele: "*Characterization of mouse embryonic cells deficient in the Ctr1 high affinity copper transporter*" J. Biol. Chem. 277 (2002) 40253-40259.
53. I. Hamza, A. Faisst, J. Prohaska, J. Chen, P. Gruss, J. D. Gitlin: "*The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis*" Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98 (2001) 6848-6852.
54. R. Tanzi, K. Petrukhin, I. Chernov, J. L. Pellequer, W. Wasco, B. Ross, et al.: "*The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene*" Nat. Genet. 5 (1993) 344-350.
55. M. J. Petris, D. Strausak, J. F. Mercer: "*The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase*" Hum. Mol. Genet. 9 (2000) 2845-2851.
56. K. Terada, T. Nakako, X. L. Yang, M. Iida, N. Aiba, Y. Minamiya, et al.: "*Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA*" J. Biol. Chem. 273 (1998) 1815-1820.
57. J.C. Yarze, P. Martin, S.J. Munoz, L.S. Friedman: "*Wilson's disease: current status*" Am J Med 92 (1992) 643-654.
58. J. L. Gollan, T.J. Gollan: "*Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects*" J.Hepatol. 28 Suppl.1 (1998) 28-36.
59. J.D. Gitlin: "*Wilson Disease*" Gastroenterology 125 (2003) 1868-1877.

60. E.A. Roberts, M.L.Schilsky: "*Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update*" *Hepatology* 47 (2008) 2089-2111.
61. K. Petrukhin, S. Lutsenko, I. Chernov, B.M. Ross, J.H. Kaplan, T.C. Gilliam: "*Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-Type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions*" *Hum. Mol. Genet.* 3 (1994) 1647-1656.
62. P. Ferenci: "*Reginal distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on geneting testing*" *Hum. Genet.* 120 (2006) 151-159.
63. K. Caca, P. Ferenci, H. J. Kuhn, H. Willgerodt, B. Kunath, J. Mossner, F. Berr: "*High prevalence of the His1069Gln mutation in East German patients with Wilson disease. Rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype correlation analysis*" *J Hepatol* 35 (2001) 575-581.
64. G. Loudianos, V. Dessì, M. Lovicu, A. Figus, A. Figus, F. Lilliu, S. De Virgiliis, A.M. Nurchi, A. Deplano, P. Moi, M. Pirastu, A. Cao: "*Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population- Evidence of a founder effect*" *Human Mut.* 14 (1999) 294-303.
65. G. Loudianos, V.Dessì, M. Lovicu, A. Angius, A.M. Nurchi, G.C. Sturniolo, M. Marcellini, L. Zancan, C. Barbera, N. Akar, P. Braggeti, R. Yagci, A. Vegnente, A. Cao, M. Pirastu: "*Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the mediterranean population*" *Hum. Mutat.* 12 (1998a) 89-94.

66. M. Lovicu, V. Dessì, A. Zappu, S. De Virgiliis, A. Cao, G. Loudianos: *"Efficient strategy for molecular diagnosis of Wilson disease in the Sardinian population"* Clin Chem 49 (2003) 496-498.
67. W. J. Oh, E. K. Kim, K. D. Park, S. H. Hahn, O. J. Yoo: *"Cloning and characterization of the promoter region of the Wilson disease"* Biochemical and Biophysical Research Communications 259 (1999) 206-211.
68. A.P. Bird: *"CpG islands and the function of DNA methylation"* Nature 321 (1986) 209-213.
69. F. Larsen, et al.: *"CpG islands as gene markers in the human genome"* Genomics 13 (1992) 1095-1107.
70. S. Labbè, J. Prévost, P. Remondelli, A. Leone, C. Séguin: *"A nuclear factor binds to the metal regulatory elements of the mouse gene encoding metallothionein-I"* Nucleic Acid Research 15 (1991) 4225-4231.
71. A. D. Carter, B. K. Felber, M. J. Walling, M. F. Jubier, C. J. Schmidt, D. H. Hamer: *"Duplicated heavy metal control sequences of the mouse metallothionein-I gene"* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 7392-7396.
72. G.M. Stuart, P.F. Searle, R.D. Palmiter: *"Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying syntetic sequences"* Nature 317 (1985) 828-831.
73. W. J. Oh, E. K. Kim, J. H. Ko, S. H. Yoo, S. H. Hahn, O. J. Yoo: *"Nuclear proteins that bind to metal response element a (MREa) in the Wilson disease gene promoter are Ku autoantigens and the Ku-*

- 80 subunit is necessary for basal transcription of the WD gene*" Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2151-2161.
74. K. Katano, A. Kondo, R. Safaei, A. Holzer, G. Samini, M. Mishima, Y. M. Kuo, M. Rochdi, S. B. Howell: "*Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper*" Cancer Research 62 (2002) 6559-6565.
75. R. Safaei, B. J. Larson, T. C. Cheng, M. A. Gibson, S. Otani, W. Naerdemann, S. B. Howell: "*Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells*" Mol. Cancer Ther. 4 (2005) 1595-1604.
76. A. P. Kumar, M. K. X. Chang, L. Fliegel, S. Pervaiz, M. V. Clement: "*Oxidative repression of NHE1 gene expression involves iron-mediated caspase activity*" Cell death and Differentiation 14 (2007) 1733-1746.
77. R. Safaei, K. Katano, G. Samini, W. Naerdemann, J. L. Stevenson, M. Rochdi, S. B. Howell: "*Cross-resistance to cisplatin in cells with acquired resistance to copper*" Cancer Chemother. Pharmacol. 53 (2004) 239-246.
78. B. W. Blakley, J. I. Cohen, N. D. Doolittle, L. L. Muldoon, K. C. Campbell, D. T. Dickey, E. A. Neuwelt: "*Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy*" Review and Summary of the annual meeting of the Blood-Brain Barrier Disruption Program, Gleneden Beach, Oregon, March 10, 2001.