



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



UNIONE EUROPEA  
Fondo sociale europeo

## Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Cellulare e Molecolare

TESI DI DOTTORATO 2005

Modulazione dell'espressione della serpina  
Proteasi Nexina 1 (PN1) in sistemi cellulari neurali  
e gliali.

Dottoranda: Dr.<sup>ssa</sup> Patrizia Lombari  
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche

Relatore: Prof.ssa Concetta Pietropaolo

Coordinatore del Dottorato: Prof. Giuseppe D'Alessio



# Indice

---

<b>INDICE</b>	<b>ii</b>
<b>ABBREVIAZIONI</b>	<b>v</b>
<b>SOMMARIO</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
<b>1.1 LE SERPINE</b>	<b>8</b>
1.1.1 <i>CARATTERISTICHE GENERALI</i>	8
1.1.2 <i>FUNZIONI DELLE SERPINE</i>	8
1.1.3 <i>STRUTTURA DELLE SERPINE</i>	10
1.1.4 <i>MECCANISMO DI INIBIZIONE</i>	11
1.1.5 <i>REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ INIBITORIA DELLE SERPINE</i>	17
1.1.6 <i>CLEARANCE E SIGNALING DELLE SERPINE</i>	19
<b>1.2 LA PROTEASI NEXINA-1</b>	<b>21</b>
1.2.1 <i>CARATTERISTICHE GENERALI</i>	21
1.2.2 <i>FUNZIONI INIBITORIE DELLA PN1</i>	21
1.2.3 <i>LA PN1 NEL SISTEMA NERVOSO</i>	23
1.2.4 <i>LA PN1 NEI PROCESSI FISIOLGICI</i>	25
<b>1.3 LA TROMBINA</b>	<b>28</b>
1.3.1 <i>CARATTERISTICHE E FUNZIONI</i>	28
<b>CAPITOLO 2 SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>32</b>
<b>2.1 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PN1</b>	<b>33</b>
<b>CAPITOLO 3 SISTEMA SPERIMENTALE</b>	<b>34</b>
<b>3.1 IL SISTEMA PER L'OVER-ESPRESSIONE INDUCIBILE</b>	<b>35</b>
3.1.1 <i>LE CELLULE PC12</i>	35
3.1.2 <i>IL SISTEMA TET-OFF</i>	35
<b>3.2 IL SISTEMA PER LO SPEGNIMENTO</b>	<b>36</b>
3.2.1 <i>LE CELLULE C6</i>	36
3.2.2 <i>L'RNA INTERFERENCE</i>	38
<b>CAPITOLO 4 MATERIALI E METODI</b>	<b>42</b>
<b>4.1 LINEE CELLULARI</b>	<b>43</b>
<b>4.2 TERRENI E CONDIZIONI DI CRESCITA</b>	<b>43</b>
4.2.1 <i>TERRENI DI CRESCITA</i>	43
4.2.2 <i>CONDIZIONI DI CRESCITA</i>	43
4.2.3 <i>TRANSFEZIONE STABILE DI CELLULE PC12 TET-OFF</i>	44
4.2.4 <i>TRANSFEZIONE TRANSIENTE DI CELLULE C6</i>	44
<b>4.3 CEPPI BATTERICI E CONDIZIONI DI CRESCITA</b>	<b>45</b>
4.3.1 <i>TERRENI DI COLTURA E CONDIZIONI DI CRESCITA</i>	45
<b>4.4 ANALISI DEL DNA BATTERICO</b>	<b>46</b>

---

4.4.1 PREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DA E. COLI	46
4.4.2 SEQUENZIAMENTO DEL DNA	46
<b>4.5 DESCRIZIONE DEI PLASMIDI</b>	<b>46</b>
4.5.1 VETTORE PTRE-RBS/PN1	46
4.5.2 VETTORE PTKHYGRO	47
4.5.3 VETTORE PAVU6+27	47
4.5.4 VETTORE PAVU6RNAI	47
<b>4.6 ANALISI DI RNA DA CELLULE EUCARIOTICHE</b>	<b>48</b>
4.6.1 ESTRAZIONE DI RNA E ANALISI MEDIANTE NORTHERN BLOT	48
4.6.2 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA	48
<b>4.7 ANALISI DI PROTEINE</b>	<b>50</b>
4.7.1 PREPARAZIONE DI LISATI	50
4.7.2 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA	50
4.7.3 SDS-PAGE (SODIUM DODECYL SULPHATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS)	51
4.7.4 WESTERN BLOT	51
<b>CAPITOLO 5 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>53</b>
<b>5.1 OVER-ESPRESIONE DELLA PN1</b>	<b>54</b>
5.1.1 ISOLAMENTO E ANALISI DI CLONI STABILI DI PC12 TET-OFF	54
5.1.2 ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO	58
5.1.3 INDUZIONE DELL'ESPRESIONE DI PN1 DIPENDENTE DALLA TROMBINA	63
<b>5.2 SILENZIAMENTO DELLA PN1</b>	<b>65</b>
5.2.1 COSTRUTTI PER RNA INTERFERENCE	65
5.2.2 TRANSFEZIONE IN CELLULE C6	68
<b>CAPITOLO 6 CONCLUSIONI</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>I</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>XII</b>



# Abbreviazioni

Attivatore tissutale del plasminogeno	t-PA
Attivatore urochinasico del plasminogeno	u-PA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Elemento responsive alla tetraciclina	TRE
Extra Cellular Matrix	ECM
Fetal Bovine Serum	FBS
Glicosaminoglicani	GAG
Low-density lipoprotein receptor related protein	LPR
Nerve Growth Factor	NGF
Pigment Epitelium Derived Factor	PEDF
Plasminogen Activator Inhibitor-1	PAI-1
Protease Activated Receptors	PAR
Proteasi Nexina 1	PN1
Protein-chinasi RNA dipendente	PKR
Reactive Center Loop	RCL
Ribosome Binding Site	RBS
RNA-dependent RNA Polimerase	RpRP
RNA-Induced Silencing Complex	RISC
Short hairpin RNA	shRNA
Small interfering RNA	siRNA
Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis	SDS-PAGE
Transattivatore controllato dalla tetraciclina	tTA
$\alpha$ -1-antitripsina	$\alpha_1$ -PI



# Sommario

Le serpine (serine proteinase inhibitors) sono una superfamiglia di proteine caratterizzate da un comune ripiegamento e dal meccanismo d'inibizione che è del tipo substrato suicida. Il meccanismo di inibizione consiste nella formazione di un complesso irreversibile tra serpina e proteasi che una volta internalizzato viene degradato. Tra le serpine la Proteasi Nexina-1 (PN1), uno tra i maggiori inibitori della trombina, è presente principalmente nella matrice del sistema nervoso centrale. La sua funzione in questo distretto si pensa sia legato all'inibizione della trombina, che su cellule nervose differenziate causa retrazione dei neuriti. Inoltre, la PN1 è espressa con un particolare *pattern* spaziale e temporale durante lo sviluppo e l'organogenesi del sistema nervoso centrale, che fa supporre un suo coinvolgimento in questi processi. Per chiarire le funzioni della PN1 sono stati messi a punto un sistema per l'over-espressione inducibile e un sistema per il silenziamento genico di questa proteina. Nel primo caso è stato utilizzato come modello sperimentale il sistema *tet-off* in cellule PC12, cellule di feocromocitoma di ratto. Le cellule PC12 sono in grado di differenziarsi in neuroni mediante aggiunta di *Nerve Growth Factor* (NGF) o mediante deprivazione di siero. Il sistema *tet-off* permette di indurre l'over-espressione della proteina di interesse e studiarne gli effetti sulle cellule. Il plasmide per l'over-espressione inducibile contenente il cDNA della PN1 è stato cotransfettato insieme al plasmide contenente il gene per la resistenza all'igromicina nelle cellule PC12 *tet-off*. I cloni stabili sono stati isolati ed amplificati. Dall'analisi delle proteine, da lisati totali mediante *western blot*, e dall'analisi dell'mRNA, mediante RT-PCR semiquantitativa, alcuni dei cloni analizzati sono risultati inducibili. I cloni che hanno mostrato una maggiore produzione di PN1, successivamente all'induzione, sono stati analizzati morfologicamente durante il differenziamento, indotto sia dall'aggiunta di NGF al mezzo, sia da deprivazione di siero. Gli esperimenti condotti in presenza di NGF hanno mostrato un ruolo protettivo, nei confronti delle cellule differenziate, dell'over-

espressione di PN1 in caso di aggiunta di trombina al mezzo di coltura. Gli esperimenti condotti in assenza di siero mostrano una diminuzione del numero di cellule differenziate in caso di over-espressione di PN1. Dai campioni analizzati morfologicamente durante il differenziamento sono stati preparati i lisati totali per osservare la produzione di PN1 mediante *western blot*. Da tale analisi è risultato un aumento di espressione della serpina indipendente dall'induzione del sistema *tet-off*. Tale aumento, da successivi esperimenti su cellule PC12 *wild-type*, è risultato dipendente sia dal tempo, sia dalla concentrazione di trombina.

Per ottenere il silenziamento genico della PN1, è stato utilizzato l'RNA *interference* in cellule C6. A questo scopo sono stati clonati nel plasmide pAVU6+27 vari tipi di oligonucleotidi, in grado di attivare il processo di RNA *interference*, a valle di un promotore per piccoli RNA. I plasmidi ottenuti sono stati transfettati nelle cellule C6. A 48 ore dalla transfezione le cellule sono state raccolte per estrarre RNA totale e lisati totali. Dall'analisi dell'RNA mediante *northern blot* è risultata una diminuzione di mRNA di PN1 variabile a seconda dei costrutti utilizzati, comunque mai superiore al 60%. Dall'analisi dei lisati, mediante *western blot*, è risultata una diminuzione della proteina di circa 80% in tre dei campioni analizzati. Sebbene il processo di RNA *interference* non provochi un'efficiente degradazione del mRNA di PN1, c'è un efficiente blocco della traduzione.



# Summary

Serpins (Serine Protease Inhibitors) belong to a protein super family sharing common structure and common inhibition mechanism involving a covalent, irreversible complex between a serpin and a target protease. The fate of such complex is internalization and degradation. Protease nexin-1 (PN1), a member of the serpin super family, is mainly produced by glial cells, and its major protease target is thrombin. A function of PN1 in the nervous system might be directed to balance the thrombin effects on cell proliferation, thus contributing to the nervous system plasticity, during development as well as in healing processes following tissue damage. To contribute to clarify PN1 functions, we have designed experimental cell systems to achieve an inducible over expression of PN1, or its silencing. For the inducible overexpression of PN1, the tet-off system has been utilized in PC12 cell line, rat pheocromocytoma cells undergoing differentiation as neurons when exposed to Nerve Growth Factor (NGF) or serum starved. The plasmid containing cDNA of PN1 and the cassette for the inducible overexpression, and the plasmid containing the hygromycin resistance cassette were co-transfected in PC12 tet-off cells. Stably transfected clones were isolated and analyzed for inducible PN1 expression, by western blot on protein lysates, and by semi-quantitative RT-PCR on RNA. The clones showing the highest induction of PN1 expression were analyzed morphologically, and treated with Nerve Growth Factor (NGF) to evaluate the morphological differentiation. Our results indicate that PN1 exerts a protection role on differentiated cells when thrombin is added. The protective effects of PN1 overexpression against thrombin exposure were less relevant when cell differentiation was achieved by serum starvation. Interestingly, a western blot analysis lysates from differentiated cells showed an increased expression of PN1 induced by thrombin, independent from tet-off regulation.

To switch off PN1 expression, RNA interference was induced in C6 cell line, derived from rat glioma cells constitutively producing PN1. To this aim, four oligonucleotides, specifically designed to

activate the RNA interfering process, were cloned in the plasmid pAVU6+27, which contain the small RNA U6 promoter cassette. The cloned plasmids were transfected in the C6 cells and after 48 hour the cells were collected to extract total RNA and protein lysates. The analysis of RNA, by Northern blot, showed a variable silencing of PN1 dependent on the transfected construct, the highest silencing reaching 60%. The analysis of protein, by Western blot, showed 80% protein silencing in three samples.



Capitolo 1

**Introduzione**

## 1.1 Le Serpine

### 1.1.1 Caratteristiche generali

La superfamiglia delle serpine é coinvolta in molti processi biologici tra i quali la coagulazione sanguigna, l'attivazione del complemento, la fibrinolisi, la morte cellulare programmata, lo sviluppo e i processi infiammatori (Carrell, Pemberton, & Boswell, 1987; Gettins, 2000; Huntington, Read, & Carrell,2000). Il nome serpina deriva dalla contrazione di *serine protease inhibitor*, ossia inibitori di proteasi a serina. Sono state identificate circa 500 serpine in organismi quali animali, virus, piante e recentemente anche in procarioti (Irving et al.,2002), composte da 350-400 amminoacidi e con un peso molecolare di 40-50kDa (Patston, 2000). Le serpine sono caratterizzate da un'architettura strutturale comune costituita da 3 foglietti  $\beta$  e 8 o 9  $\alpha$ -eliche (Elliott et al.,1998). Nonostante la struttura terziaria delle serpine sia altamente conservata, la comparazione delle strutture primarie rivela una similarità molto bassa (circa il 25%, Getting, 2002). Le serpine hanno caratteristiche funzionali molto diversificate, per questo motivo sono state arbitrariamente suddivise in ben 16 classi (da A a P) con altre 10 serpine classificate come orfani (Irving et al., 2000 e Silverman et al., 2001). La successiva classificazione, basata sulla struttura genica e sulla composizione amminoacidica dei domini strutturali, le suddivide in sei sottogruppi(Ragg et al.,2001). La maggior parte delle serpine ha attività inibitoria sebbene siano stati identificati alcuni membri di questa superfamiglia che non possiedono proprietà inibitorie, come l'angiotensinogeno e l'ovalbumina. Inoltre le serpine possono avere una localizzazione sia intracellulare che extracellulare.

### 1.1.2 Funzioni delle serpine

Data l'importanza delle serpine in molti importanti processi fisiologici e il loro coinvolgimento in patologie in caso di disfunzione,

le serpine umane sono le più caratterizzate del gruppo. Nel plasma umano gli inibitori di proteasi sono quasi esclusivamente serpine e molte di esse hanno come bersaglio la Trombina, altre sono più specializzate come inibitori della proteasi fibrinolitica plasmina, come gli attivatori tissutale e urochinasico del plasminogeno (t-PA e u-PA). Molte serpine, come l'antitrombina III, il cofattore II dell'eparina, la PNI, e l'inibitore della proteina C, hanno un sito di legame per l'eparina che può in alcuni casi portare ad un'accelerazione del tasso di inibizione e un possibile ruolo nella localizzazione della proteina (Huntington, 2003).

L'archetipo della famiglia è l' $\alpha$ -1-antitripsina ( $\alpha_1$ -PI), il maggiore inibitore antiproteolitico del plasma sanguigno, scoperto nel 1955 (van Gent et al., 2003). Questa proteina è il principale inibitore dell'elastasi ed è espressa ad alti livelli durante l'infiammazione: è infatti una proteina della fase acuta. Molti lavori sono stati pubblicati su questa proteina, dato l'alto numero di polimorfismi: sono stati trovati ben 80 alleli (Cox, 1989) tutti associati a malattie. In particolare, bassi livelli di espressione di  $\alpha_1$ -PI sono associati ad enfisema polmonare.

Delle 34 serpine umane identificate, 7 appartengono alla classe delle serpine non inibitorie. Queste sono essenzialmente proteine che legano gli ormoni e sciaperonine del collagene, come la Heat Shock Protein 47. Altri processi fisiologici in cui intervengono le serpine sono la digestione, la regolazione di proteine e la modificazione della matrice extracellulare. Molte sono inoltre le prove dell'importanza delle serpine nello sviluppo e nell'omeostasi del sistema nervoso centrale (Yoshida and Shiosaka, 1999). Infatti durante lo sviluppo neuronale, le proteasi a serina, insieme con i loro inibitori, le serpine appunto, intervengono nella migrazione cellulare, nell'estensione degli assoni e nell'eliminazione delle sinapsi. Nell'adulto, inoltre, sono essenziali per il processamento di neuropeptidi, per la regolazione della sopravvivenza neuronale e della plasticità delle cellule neuronali legata ai processi di apprendimento e memoria. Il

loro meccanismo di azione probabilmente è implicato nella degradazione della matrice extracellulare, l'attivazione/inibizione dei recettori PAR (*Protease Activated Receptors*) o l'attivazione-inibizione di altre serin-proteasi (Molinari et al., 2003). Per esempio l'u-PA e il t-PA convertendo il plasminogeno in plasmina, producono il rimodellamento delle connessioni sinaptiche (Saksela and Rifkin, 1988), inoltre t-PA è in grado di regolare la funzionalità delle sinapsi glutaminergiche (Gingrich and Traynelis, 2000). Altre proteasi, che hanno un importante ruolo nello sviluppo e nell'omeostasi del sistema nervoso, sono la trombina e la neuropsina. Le serpine giocano un ruolo fondamentale nel regolare l'azione delle serin-proteasi nel sistema nervoso. Uno squilibrio tra proteasi e anti-proteasi è causa di difetti e malattie del sistema nervoso. È stato visto ad esempio che nella forma severa del ritardo mentale autosomico recessivo è proprio una serpina, la neurotripsina espressa nella regione presinaptica della membrana assonale, ad avere una delezione di 4 basi (Wolfer et al., 2001). Anche la neuroserpina è stata associata a forme di demenza familiare in cui c'è la formazione di corpi di inclusione (Davis et al., 1999).

Infine, le serpine svolgono un ruolo molto importante anche nella migrazione cellulare durante lo sviluppo. In *Drosophila* una serpina è implicata nella formazione del gradiente dorso ventrale (Ligoxygakis et al., 2003; Rushlow, 2004), mentre nei mammiferi è stato visto che la PN1 è coinvolta nell'organogenesi e nello sviluppo del sistema nervoso (Mansuy et al, 1993; Drapkin et al, 2002; Blasi et al., 2002).

### 1.1.3 Struttura delle serpine

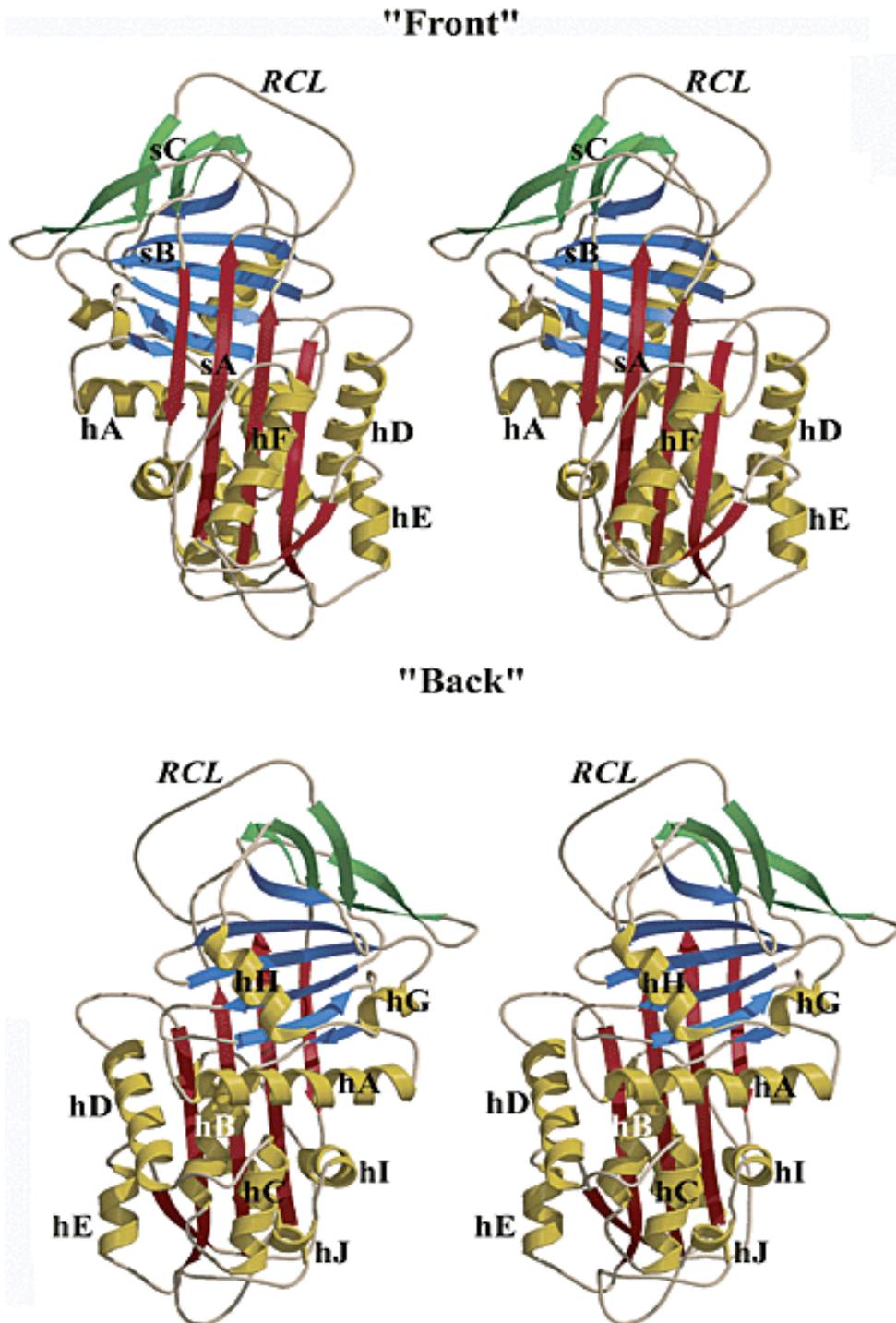
La capacità di andare incontro a cambi conformazionali è cruciale per le funzioni fisiologiche di molte proteine, e le serpine sono un chiaro caso in cui tali cambiamenti si sono sviluppati nel corso

dell'evoluzione, per permettere la modulazione dell'attività funzionale. La versatilità di struttura e delle funzioni può anche spiegare come le serpine possano essere diventate gli inibitori di proteasi per eccellenza negli organismi superiori. La reattività chimica, la struttura molecolare e le proprietà fisiche delle serpine permettono a queste proteine di assumere svariate conformazioni e stati di assemblamento in condizioni fisiologiche. Tali cambiamenti conformazionali, che vanno dalla forma nativa, con attività inibitoria, a numerose forme non inibitorie, sono stati trovati in numerosi tessuti e nel sito dell'infiammazione, ma la loro funzione biologica e il loro coinvolgimento diretto in stati patologici non sono stati ancora chiariti (Janciauskiene, 2001).

Il RCL (*Reactive Centre Loop*, fig. 1) è un motivo strutturale con un legame scindibile tra i residui P1 e P1', che viene riconosciuto e tagliato dalla proteasi bersaglio. Nella conformazione nativa mostrata in fig. 1, il RCL si trova esposto, al di fuori del "core" della proteina. La lunghezza del RCL è pressochè invariata nelle serpine con attività inibitoria, esso è costituito solitamente da 16-17 residui sul lato N-terminale del legame reattivo, 5-9 sul lato carbossiterminale. Questa così forte stringenza di lunghezza, soprattutto sul lato N-terminale, è direttamente correlata al meccanismo di inibizione. La conformazione del RCL mostra una grande variabilità, suggerendo che non è necessaria una struttura specifica per l'attività della serpina.

#### 1.1.4 Meccanismo di inibizione

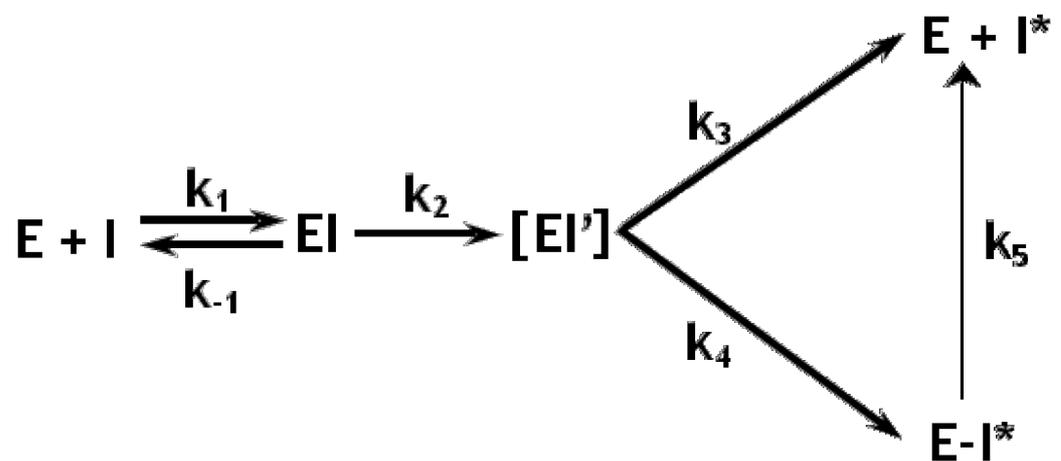
Le caratteristiche più importanti del meccanismo di inibizione delle serpine sono le seguenti: 1) avviene un drastico cambio conformazionale, 2) l'inibizione risulta in una trappola cinetica, 3) il complesso proteasi/serpina è covalente e irreversibile. Queste caratteristiche sono in contrasto con ciò che succede nelle altre classi



*Fig 1. Struttura di una serpina tipica (la  $\alpha_1$ -PI) in cui è evidenziata la disposizione delle strutture secondarie. I tre foglietti  $\beta$  sono indicati con la s da A a C, le otto  $\alpha$ -eliche indicate con la h da A a H. Nella struttura è ben evidente il RCL (Reactive Centre Loop) in posizione completamente esposta al solvente.*

di inibitori di proteine o proteasi. Infatti generalmente l'inibizione è dovuta ad un legame debole non covalente tra inibitore e proteina, legame consentito da una forte componente strutturale, tipo chiave-serratura, inoltre si hanno piccoli cambiamenti conformazionali in entrambe le proteine e la formazione di un complesso finale che è stabile termodinamicamente ma del tutto reversibile (Bode and Huber, 1992).

Il meccanismo di inibizione delle serpine è definito come un meccanismo con un pathway ramificato ed è del tipo substrato suicida, in pratica la proteasi attacca il RCL, e in particolare il legame reattivo, come un possibile substrato e agisce su di esso tagliandolo. Le tappe del meccanismo di inibizione sono schematizzate in fig 2. Come passo iniziale si ha la formazione di un complesso non covalente reversibile (EI in fig. 2), tipo Michaelis-Menten, quindi si ha l'attacco della proteasi sul legame reattivo della serpina, con la formazione di un complesso tetraedrico intermedio (EI' in fig 2, Wilmouth et al., 2001). Solo a questo punto avviene il taglio del legame peptidico P1-P1' nel RCL della serpina, la reazione può quindi proseguire con la formazione di un legame covalente tra serpina e proteasi (avviene il cambio conformazionale in cui il RCL insieme ad alcuni residui della proteasi si inseriscono nel foglietto  $\beta$  A, fig. 1, che costituisce la trappola cinetica, E-I\* in fig. 2) oppure si ha il rilascio della proteasi attiva e della serpina inattiva (E+I\* in fig. 2). Una tappa cruciale della cinetica di inibizione è la formazione del complesso di Michaelis-Menten. In questa tappa le uniche strutture coinvolte sono il sito attivo della proteasi che riconosce il sito di taglio sul RCL, che è anche l'altra struttura coinvolta. Non vi è alcun cambio di conformazione ma semplicemente il RCL perde parte dei suoi gradi di movimento. Questo significa che ci sono pochi contatti tra proteasi e serpina e che questi coinvolgono solo il RCL, come dimostrato da studi di NMR (Ye et al., 2001). È in questa tappa che avviene il reclutamento della serpina come possibile substrato e il riconoscimento da parte della proteasi del sito di taglio sul RCL. La



*Fig 2. Schema del meccanismo di inibizione delle serpene che mostra solo gli intermedi principali. I rappresenta la serpina, E rappresenta la proteasi.*

tappa successiva è il taglio da parte della proteasi, mediante la formazione di un legame acil-estereo tra la serina della proteasi e il legame reattivo della serpina (Jesty, 1979), che porta come conseguenza il cambio di conformazione della serpina. Il RCL si inserisce nel foglietto  $\beta$  A trascinando con sé alcuni residui del sito attivo della proteasi che verrà intrappolata con un legame covalente alla serpina (come dimostrato da studi cristallografici da Huntington et al., 2000). Il meccanismo del pathway ramificato della serpina come substrato suicida richiede che, per un'efficiente inibizione, la formazione del complesso irreversibile deve essere molto più veloce rispetto all'idrolisi del legame acil-estereo (ossia  $k_4 \gg k_3$ , fig. 2). Questo significa che è la velocità dell'inserzione del RCL nel foglietto  $\beta$  A a determinare l'efficienza dell'inibizione. Questo cambio conformazionale porta all'inserimento nel "core" della proteina di residui che precedentemente erano esposti al solvente e quindi la composizione del RCL è di grande importanza nel meccanismo di inibizione delle serpene. Infatti comparando le sequenze di RCL di varie serpene (fig. 3) si nota come, soprattutto dalla posizione P15 alla posizione P8 (maggiormente implicati nell'inserimento dell'RCL), la composizione amminoacidica è pressochè invariata. Osservazione che non risulta vera per le serpene non inibitorie, dimostrando l'importanza della composizione dell'RCL per il meccanismo di inibizione (Irving et al, 2000; Hopkins and Whisstock, 1994). Anche la lunghezza del RCL prima del legame reattivo è pressochè invariata nelle serpene. Essa è sempre 17 residui fatta eccezione per crmA, l'inibitore di C1 e l' $\alpha_2$ -antiplasmina nelle quali è di 16 residui. Questa invarianza è correlata al meccanismo stesso di inibizione che prevede la traslocazione della proteasi al polo distale della serpina dal sito iniziale di interazione. Inoltre in questa posizione si deve creare una pressione sulla proteasi sufficiente a trattenerla legata alla serpina in modo da deformare il sito attivo e creare la trappola cinetica (fig. 4). Per molti versi il meccanismo inibitorio delle serpene può essere

serpin	P15	P14	P13	P12	P11	P10	P9	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Inhibitory																			
A1; $\alpha_1$ -PI	G	T	E	A	A	G	A	M	F	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
A2	G	T	E	A	T	G	A	P	H	L	E	E	K	A	W	S	K	Y	Q
A3; $\alpha_1$ -ACT	G	T	E	A	S	A	A	T	A	V	K	I	T	L	L	S	A	L	V
A4; kallistatin	G	T	E	A	A	A	A	T	T	F	A	I	K	F	F	S	A	Q	T
A5; PCI	G	T	R	A	A	A	A	T	G	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
A9; centerin	G	T	E	A	T	A	A	T	T	T	K	F	I	V	R	S	K	D	G
A10; PZI	G	T	E	A	V	A	G	I	L	S	E	I	T	A	Y	S	M	P	P
B1; MNE1	G	T	E	A	A	A	A	T	A	G	I	A	T	F	C	M	L	M	P
B2; PAI-2	G	T	E	A	A	A	G	T	G	G	V	M	T	G	R	T	G	H	G
B3; SCCA1	G	A	E	A	A	A	A	T	A	V	V	G	F	G	S	S	P	A	S
B4; SCCA2	G	V	E	A	A	A	A	T	A	V	V	V	V	E	L	S	S	P	S
B6; PI6	G	T	E	A	A	A	A	T	A	A	I	M	M	M	R	C	A	R	F
B7; megsin	G	T	E	A	T	A	A	T	G	S	N	I	V	E	K	Q	L	P	Q
B8; P18	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	V	R	N	S	R	C	S	R	M
B9; P19	G	T	E	A	A	A	A	S	S	C	F	V	V	A	E	C	C	M	E
B10; bomapin	G	T	E	A	A	A	G	S	G	S	E	I	D	I	R	I	R	V	P
B11; epipin	G	T	E	A	A	A	A	T	G	D	S	I	A	V	K	S	L	P	M
B12;	G	T	Q	A	A	A	A	T	G	A	V	V	S	E	R	S	L	R	S
B13; headpin	G	T	E	A	A	A	A	T	G	I	G	F	T	V	T	S	A	P	G
C1; antithrombin	G	S	E	A	A	A	S	T	A	V	V	I	A	G	R	S	L	N	P
D1; heparin cofactor II	G	T	Q	A	T	T	V	T	T	V	G	F	M	P	L	S	T	Q	V
E1; PAI-1	G	T	V	A	S	S	S	T	A	V	I	V	S	A	R	M	A	P	E
E2; protease nexin 1	G	T	K	A	S	A	A	T	T	A	I	L	I	A	R	S	S	P	P
F2; $\alpha$ antiplasmin <sup>a</sup>	G	V	E	A	A	A	A	T	S		I	A	M	S	R	M	S	L	S
G1; C1-inhibitor <sup>a</sup>	G	V	E	A	A	A	A	S	A		I	S	V	A	R	T	L	L	V
I1; neuroserpin	G	S	E	A	A	A	V	S	G	M	I	A	I	S	R	M	A	V	L
I2; MEPI	G	S	E	A	A	T	S	T	G	I	H	I	P	V	I	M	S	L	A
Noninhibitory																			
A6; CBG	G	V	D	T	A	G	S	T	G	V	T	L	N	L	T	S	K	P	I
A7; TBG	G	T	E	A	A	A	V	P	E	V	E	L	S	D	Q	P	E	N	T
A8; angiotensinogen	E	R	E	P	T	E	S	T	Q	Q	L	N	K	P	E	V	L	E	V
B5; maspin	G	G	D	S	I	E	V	P	G	A	R	I	L	Q	H	K	D	E	L
F1; PEDF	G	A	G	T	T	P	S	P	G	L	Q	P	A	H	L	T	F	P	L
H1; colligin 1	G	N	P	F	D	Q	D	I	Y	G	R	E	E	L	R	S	P	K	L
H2; colligin 2	G	N	P	F	D	Q	D	I	Y	G	R	E	E	L	R	S	P	K	L

Fig. 3 Comparazione della sequenza amminoacidica del RCL di varie serpine.

paragonato ad una trappola per topi, che conserva la sua energia per schiacciare e uccidere il topo. Per far sì che ciò avvenga è necessaria un'esca (il RCL) e che il topo azioni la trappola (il taglio dell'enzima al legame reattivo, Huntington, 2003).

### 1.1.5 Regolazione dell'attività inibitoria delle serpine

Sono state trovate molte serpine nel circolo sanguigno che sono attivate come inibitori della proteasi bersaglio dal legame con l'eparina o altri glicosaminoglicani lineari carichi negativamente (GAG). Ne sono un esempio l'antitrombina III, PAI-1, l'inibitore della proteina C e la PN1, un gruppo di serpine coinvolte nella regolazione di proteasi della coagulazione e della fibrinolisi. Il risultato dell'interazione tra serpina e GAG è un incremento di mille volte della velocità di reazione. Sono due, principalmente, i meccanismi di attivazione da parte dei GAG: 1) le molecole di GAG fanno da ponte tra la proteasi e la serpina, dando ad esse il corretto orientamento per l'interazione tra il RCL della serpina e il sito attivo della proteasi; 2) attraverso il legame ai GAG la serpina subisce un cambio conformazionale che la rende più reattiva nei confronti della proteasi.

Un altro tipo di regolazione riguarda l'inibizione delle serpine da parte di proteasi non specifiche. L'esposizione del RCL, necessaria all'attività inibitoria, lo rende particolarmente suscettibile all'attacco di proteasi non specifiche, causando l'inserzione del RCL e l'inattivazione della serpina. In particolare è stato visto che le metalloproteasi possono tagliare il RCL di serpine quali  $\alpha_1$ -PI, l'antitrombina e  $\alpha_1$ -antichimotripsina. Sebbene la posizione del taglio possa variare da serpina a serpina, si ha in ogni caso l'inattivazione della serpina con la formazione di uno stato conformazionale simile a quello dell'inserimento dell'RCL nel foglietto  $\beta$  A. Un possibile ruolo fisiologico di questa inattivazione potrebbe essere il rimodellamento della matrice extracellulare. Infatti è stato visto che  $\alpha_1$ -PI è *in vivo* uno specifico substrato per la metalloproteasi MMP-9 ed è tagliato



*Fig. 4* Struttura del complesso proteasi/serpina. In blu è evidenziato il RCL inserito nel foglietto  $\beta$  A della serpina.

durante la separazione derma-epidermide. Questo processo è dovuto ad un incremento dell'attività dell'elastasi dovuta all'inattivazione di  $\alpha_1$ -PI da parte di MMP-9 (Liu et al., 2000).

### 1.1.6 Clearance e signaling delle serpine

Nell'uomo, l'emivita del complesso proteasi-serpina in circolazione è molto più breve di quella della forma nativa, la prima è solo poche ore mentre la seconda è più di 24 ore (Ohlsson, 1976). Il recettore che regola la *clearance* del complesso è il LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*). Esso fa parte della famiglia dei recettori LDL, composta da proteine transmembrana con molti domini ripetuti che sono associate al metabolismo delle lipoproteine e delle proteasi. LRP è uno dei più grandi membri della famiglia con un precursore di 600 kDa che viene tagliato durante il passaggio nel Golgi in una catena  $\alpha$  di 515 kDa extracellulare e una catena  $\beta$  di 85 kDa che contiene l'unico dominio transmembrana ed è associata non covalentemente alla catena  $\alpha$  nel lato extracellulare della membrana. La catena  $\alpha$  contiene ben 31 copie del dominio detto di legame al ligando (LB) che sono organizzate in *cluster* ed è proprio su questi *cluster* che avviene il legame con il ligando, nel nostro caso il complesso proteasi/serpina. Oltre al LRP altri membri della famiglia con le stesse caratteristiche strutturali sono coinvolti nella *clearance* di questi complessi, essi sono il LRP2 e il VLDLR. Ognuno di questi recettori ha un differente range di specificità per i singoli complessi proteasi/serpina sebbene sembra che LRP abbia la minore specificità e legni la maggior parte dei complessi che si formano (Gettins, 2002).

Il metabolismo del complesso proteasi/serpina può essere diviso in tre fasi; in una prima fase si ha il legame al recettore, nella seconda fase avviene l'internalizzazione, nella terza si ha la degradazione del complesso e il ripristino del recettore sulla membrana. In particolare per quanto riguarda la degradazione del complesso, il destino delle due specie che ne fanno parte è diverso;

infatti la serpina viene degradata mentre la proteasi viene rimessa in circolo (Gettins, 2002).

Infine alcune evidenze mostrano la possibilità che LRP, LRP2, e VLDLR possano attivare secondi messaggeri legando al lato intracellulare proteine adattatori. Ad esempio i complessi di  $\alpha_1$ -antichimotripsina e catepsina G stimolano la produzione di interleuchina 6 in fibroblasti di fegato umani, mentre il mezzo condizionato prelevato dalle colture trattate stimola la produzione di  $\alpha_1$ -antichimotripsina e altre proteine coinvolte nella risposta alla fase acuta (Kurdowska and Travis, 1990). Inoltre i complessi di  $\alpha_1$ -antichimotripsina e chimotripsina inibiscono l'attivazione della NADPH ossidasi che normalmente si verifica in seguito a stimolazione dei neutrofili (Schuster et al., 1992). Ancora i complessi di  $\alpha_1$ -PI e elastasi hanno proprietà chemotattiche sui neutrofili associate con la regione C-terminale della serpina complessata (Banda et al., 1988).

Ci sono anche una serie di esempi che mostrano come le serpine da sole possono avere attività mediata da recettori. È il caso delle forme tagliate o latenti dell'antitrombina che hanno proprietà antiangiogeniche (Dawson et al., 1999), osservate anche con la serpina PEDF (Pigment Epitelium Derived Factor) che mostra anche proprietà neurotrofiche (Steele et al., 1993). In quest'ultimo caso ci sono prove del coinvolgimento di uno specifico recettore (Aymerich et al., 2001).

Il folding delle serpine rappresenta un sottile equilibrio tra due contrastanti necessità. Da una parte, c'è bisogno di dirigere il folding verso una struttura metastabile, in modo da conservare la capacità di andare incontro a interconversioni conformazionali, indispensabili per il normale meccanismo di inibizione. Dall'altra, si devono evitare inappropriate o premature inattivazioni attraverso la conversione nello stato latente o con la polimerizzazione. Il fatto che sia un sottile equilibrio è dimostrato da una serie di mutazioni puntiformi in diverse serpine che portano a perdita delle proprietà funzionali associate, nell'uomo, a diverse patologie. Nonostante questo aspetto negativo,

le serpine sono ampiamente distribuite e in molti casi sono gli inibitori di proteasi per eccellenza per la regolazione di pathway proteasi-dipendenti, negli organismi pluricellulari. Ciò indica che devono esserci dei vantaggi sull'utilizzo delle serpine piuttosto che degli inibitori fondati sul meccanismo chiave-serratura, come avvalorato dal loro mantenimento e moltiplicazione, tramite duplicazione genica, nel corso dell'evoluzione.

## 1.2 La Proteasi Nexina-1

### 1.2.1 Caratteristiche generali

La PN1 è una serpina del peso di 43-50 kDa. Si tratta di una proteina glicosilata secreta che è un potente inibitore di proteasi a serina quali la tripsina, la trombina, l'u-PA, il t-PA e la plasmina. Al contrario dell'antitrombina e del cofattore II dell'eparina, la PN1 è scarsamente rilevabile nel sangue (Baker and Gronke, 1986). Mentre è prodotta da numerosi tipi cellulari tra cui le cellule gliali, i fibroblasti, in cellule muscolari striate e lisce e nei neuroni. La presenza del gene è stata osservata nell'uomo e nei roditori, anche se è stato isolato nel pesce zebra un cDNA con alta omologia con quello della PN1 dei mammiferi (Clark et al., 1998). *In vivo* la PN1 viene espressa in un caratteristico *pattern* spaziale e temporale durante lo sviluppo e l'organogenesi del sistema nervoso dei topi (Mansuy et al., 1993), negli adulti è costitutivamente espressa in specifiche popolazioni neuronali.

### 1.2.2 Funzioni inibitorie della PN1

Come già menzionato la PN1 è in grado di inibire diverse proteasi quali la plasmina, la trombina, il t-PA, l'u-PA, l'inibitore di C1 e il fattore Xa. Le  $k_{ass}$  per queste interazioni sono intorno a valori

di  $10^5 \text{ mol}^{-1}$ . Sembra quindi che lo spettro di inibizione della PN1 sia piuttosto ampio. In realtà la situazione cambia quando si studiano queste interazioni *in vivo*. A modificare notevolmente le capacità inibitorie della PN1 è soprattutto il legame con i GAG, in particolar modo con l'eparina, (Evans et al., 1991). L'interazione con questi composti avviene, come nel caso delle altre serpine attraverso residui basici presenti sull' $\alpha$ -elica D (fig.1, Rovelli et al., 1992; Stone et al., 1994). L'interazione PN1/Proteasi che più di tutte risulta essere migliorata dopo il legame con i GAG è quella tra PN1 e trombina con una  $k_{\text{ass}}$  maggiore di quella tra trombina e antitrombina III, il principale inibitore della trombina nel sangue (Scott et al., 1985). Poiché anche la trombina è in grado di legare questi GAG è presumibile che questi fungano da ponte e guidino le due proteine nel corretto orientamento per far avvenire la reazione di inibizione. Tale meccanismo come già menzionato è frequente tra le serpine, come ad esempio l'antitrombina III e il cofattore II dell'eparina, cosa meno frequente è il fatto che anche la forma tagliata della PN1 conserva una elevata affinità per l'eparina (Evans et al., 1991). Questa caratteristica peculiare è importante per il processo di internalizzazione del complesso PN1/Trombina tramite i recettori LPR. Sono stati, infatti, caratterizzati i processi di internalizzazione dei complessi PN1/trombina e PN1/u-PA. In entrambi i casi prima del legame con il LRP si ha un'interazione con una terza proteina, che nel caso del complesso PN1/trombina interagisce con l'eparina mentre nel caso del complesso PN1/u-PA interagisce con la proteasi. Dall'analisi di mutanti di PN1 al sito di legame per l'eparina è stato visto che i complessi tra la proteina mutata e la trombina non sono internalizzati in maniera efficiente (Knauer et al., 1997), i complessi con l'u-PA, invece, non mostrano differenze nel processo di internalizzazione ma vengono rapidamente esocitati (Crisp et al., 2000).

Un'altra interazione che modifica la specificità della PN1 è quella con il Collagene di tipo IV (Donovan et al., 1994). Tale

associazione provoca una diminuzione della formazione dei complessi con u-PA e plasmina, mentre non ha alcun effetto sulla formazione del complesso PN1/trombina.

Questa serie di evidenze porta ad ipotizzare che il principale bersaglio fisiologico della PN1 sia la trombina, anche se non si può escludere un ruolo importante di questa serpina nell'inibizione dell'u-PA e del fattore XIa.

### *1.2.3 La PN1 nel sistema nervoso*

La localizzazione della PN1 in preponderanza nei tessuti del sistema nervoso fa presupporre un suo ruolo importante per l'omeostasi di questo sistema. La PN1 è in grado di antagonizzare gli effetti della trombina su cellule neurali quali astrociti e cellule gliali. Infatti la trombina causa una variazione morfologica in queste cellule rendendole simili a cellule epiteliali. Inoltre a concentrazioni più elevate è in grado di stimolare la proliferazione di tali cellule (Cunningham, 1992). La PN1 è in grado, grazie alla sua attività inibitoria, di revertire le modificazioni causate dalla trombina, innescando il processo di stellazione (Gurwitz and Cunningham, 1990). L'equilibrio tra PN1 e trombina è dunque molto importante sia per proteggere il tessuto nervoso da stravasi, sia nel caso di formazione di nuove connessioni cellulari. A dimostrazione dell'importanza di questo equilibrio ci sono le numerose condizioni patologiche, tra cui la gliosi, in cui la PN1 è coinvolta.

La PN1 sembra svolgere un ruolo nello sviluppo embrionale e nella plasticità di alcune aree cerebrali nei roditori, anche la trombina sembra essere coinvolta in questi processi fisiologici data l'evidenza di una coespressione spaziale e temporale di PN1 e recettori della trombina (Nicolu et al., 1998). Questo lascia presupporre che l'equilibrio tra PN1 e trombina possa spostarsi a favore della prima nel caso si debbano indurre a differenziare le cellule neurali per stabilire nuove connessioni, a favore della seconda

nel caso in cui tali connessioni devono essere distrutte, data la capacità della trombina di revertire il differenziamento delle cellule nervose. La trombina viene prodotta come precursore inattivo, la protrombina, i fattori di coagulazione che permettono la sua conversione in enzima attivo sono presenti nel sangue ma ci sono evidenze che possono essere espressi in particolari condizioni in distretti diversi, rendendo possibile la produzione di trombina attiva anche nel sistema nervoso (Shikamoto and Morita, 1999).

Le zone del cervello che mostrano una maggiore espressione della PN1 sono il mesencefalo (Kury et al., 1997) e il bulbo olfattivo (Cunningham and Gurwitz, 1989). Il *pattern* di espressione è però diverso nei due distretti, nel mesencefalo la produzione di PN1 diminuisce drasticamente a pochi giorni dalla nascita, mentre nel bulbo olfattivo si mantiene a livelli più bassi ma è costante nella vita dell'individuo. Tale diversa situazione può essere spiegata considerando che il bulbo olfattivo è sede di continui riarrangiamenti sinaptici dovuti alla risposta a stimoli sensoriali, ed è quindi importante la presenza costante della PN1.

Un altro distretto in cui la PN1 è presente in concentrazioni considerevoli è la barriera emato-encefalica (Cunningham et al., 1993). Il suo ruolo in questo caso è quello di proteggere il sistema nervoso da eventuali stravasi, data l'alta concentrazione nel plasma di trombina. Come già detto ad alte concentrazioni la trombina causa la proliferazione di cellule gliali ed in casi gravi si arriva alla patologia detta gliosi. La conseguenza di questa proliferazione indiscriminata provoca la morte delle cellule nervose e la formazione di tessuto cicatrizzato (Shea, 1995), danneggiando in modo irreversibile l'area cerebrale interessata. Questo è quello che avviene in caso di ictus seguito da emorragia cerebrale, infatti la quantità di PN1 presente nel cervello non è in grado di inibire la grande quantità di trombina riversata dall'emorragia.

La presenza della PN1 è stata inoltre rilevata nelle placche del morbo di Alzheimer, con l'osservazione che la PN1 è in grado di

aumentare la percentuale di neuroni che sopravvivono all'esposizione del peptide  $\beta$ -amiloide mentre la trombina aumenta la tossicità di questo peptide (Smith-Swintowsky et al., 1995). Ciò fa supporre un ruolo protettivo della PN1 nei confronti di questa malattia, ipotesi avvalorata dal fatto che questa serpina è in grado di inibire il fattore Xla (Knauer et al., 2000), la proteasi che taglia la proteina precursore dell'amiloide causando il rilascio del peptide  $\beta$ -amiloide e la conseguente formazione di placche.

Negli ultimi anni sono stati creati topi transgenici che o over-esprimono la PN1 nei neuroni dopo la nascita o sono *knock-out* per questa serpina. Nel primo caso i topi mostrano un'alterata trasmissione sinaptica già nelle prime fasi vitali. Con il progredire dell'età si ha lo sviluppo di disturbi nel comportamento motorio, con cambiamenti istopatologici, un'atrofia muscolare neurogenica e ancora un'integrazione sensomotoria sbilanciata. Dai risultati ottenuti si evince che questi fenotipi sono dovuti ad una disfunzione assonale piuttosto che alla morte dei neuroni. In particolare è stato osservato che i neuroni con lunghe proiezioni assionali e i motoneuroni spinali hanno una vulnerabilità alla PN1, che aumenta con il tempo, causando assonopatie (Meins et al., 2001). Mentre topi *knock-out* per il gene della PN1 mostrano una diminuzione della fertilità, causata da un'alterata composizione delle proteine del liquido seminale, e una maggiore propensione a manifestare fenomeni epilettici, dovuta ad un inefficiente funzionamento dell'ippocampo (Murer et al., 2001; Luthi et al., 1997).

#### 1.2.4 La PN1 nei processi fisiologici

Oltre al suo importante ruolo nel sistema nervoso la PN1 esercita importanti funzioni in diversi processi fisiologici. È stato ad esempio osservato che l'espressione del gene SRY, che svolge un ruolo fondamentale nel differenziamento delle gonadi maschili, induce la produzione di PN1 da parte delle cellule staminali che daranno origine

alle cellule di Sertoli (Grimmond et al., 2000). Per la differenziazione di tali cellule è fondamentale il ruolo della lamina basale. Si pensa che la PN1 possa agire proteggendo tale struttura dall'attacco di proteasi, grazie alla sua interazione con il Collagene di tipo IV, una delle proteine maggiormente presenti nella lamina basale. Il ruolo della PN1 nelle gonadi potrebbe coinvolgere anche il meccanismo dell'ovulazione ed in particolare la rottura del follicolo. Molte serpine sono sicuramente coinvolte in questo processo e sembra che PAI-1 svolga il ruolo più importante (Hagglund et al., 1996).

L'espressione della PN1 è stata inoltre osservata a livello della placca neuromuscolare (Kim et al., 1998). Questa osservazione concorda con la teoria secondo la quale la formazione/distruzione di sinapsi neuromuscolari sia dovuta ad una cascata di proteasi e serpine, le prime atte a distruggere tali giunzioni, le seconde responsabili del loro mantenimento. È infatti noto che le terminazioni nervose vengono guidate da gradienti di molecole presenti nella matrice extracellulare (Pires Neto et al., 1999). La produzione della PN1 avviene soprattutto ad opera delle cellule muscolari ed in particolare nei miotubuli (Mbebi et al., 1999). Nella giunzione neuromuscolare la PN1 colocalizza perfettamente con i recettori dell'acetilcolina e la acetilcolinesterasi, quindi esattamente nella regione sinaptica (Festoff et al., 1991). In caso di infiammazioni croniche quali miopatie infiammatorie e in seguito a danno muscolare la concentrazione della PN1 nei distretti interessati risulta aumentata (Mbebi et al., 1999). Tali osservazioni fanno ipotizzare un ruolo protettivo della PN1 nei confronti delle sinapsi neuromuscolari.

Un'altra localizzazione della PN1 è stata osservata nella matrice extracellulare dei fibroblasti del derma. In questo distretto si pensa che la PN1 possa regolare l'attività della trombina che è in grado di indurre la proliferazione di queste cellule (Voret Craviari et al., 1992). In caso di danni tissutali provocati da ferite, parte della trombina attivata nella cascata coagulativa rimane intrappolata nel derma, quindi tale proteasi potrebbe avere un ruolo importante nella

rigenerazione tissutale e la sua attività potrebbe essere regolata dalla PN1 presente nel derma. Ci sono alcune evidenze che correlano una overespressione della PN1 con lo scleroderma (Strehlow et al., 1999). Il fenotipo di questa malattia è un accumulo della matrice extracellulare del derma. Gli alti livelli di PN1 prodotti potrebbero agire inibendo proteasi responsabili della degradazione della matrice, inoltre la PN1 è in grado di favorire la produzione del protocollagene, che è sicuramente uno dei fattori responsabili dello scleroderma.

Il ruolo della PN1 nelle gonadi, nella giunzione neuromuscolare e nello scleroderma è fortemente legato alla composizione della matrice extracellulare. Anche il ruolo nel differenziamento su cellule neuronali può essere ricondotto ad una azione sulla matrice extracellulare se si considera il meccanismo di "guidance" citato in precedenza. Infine ci sono recenti prove di una correlazione tra overespressione della PN1 e migrazione delle cellule tumorali; la PN1 causa una variazione della produzione della matrice extracellulare che favorisce la migrazione (Buchholz et al., 2003). Tale fenomeno è stato osservato anche in condizioni fisiologiche durante lo sviluppo embrionale (Drapkin et al., 2002). L'insieme di queste evidenze sperimentali suggerisce che la PN1 svolga un ruolo inibitorio principalmente come agente che regola la degradazione della matrice extracellulare.

Per finire la PN1 potrebbe avere un ruolo anche nella cascata coagulativa mediante l'inibizione del fattore XIa. Sebbene la PN1 non sia presente in significative quantità nel torrente circolatorio viene comunque secreta dalle piastrine in seguito alla loro attivazione (Detwiler et al., 1992). Il legame con i GAG poi rende la formazione del legame PN1/fattore XIa cento volte più rapida della formazione del legame inibitore C1/fattore XIa, inibitore C1 che si pensava fosse l'inibitore fisiologico. Tale valore rispecchia quelli che si riscontrano per l'inibizione fisiologica di altre proteasi. Infine la PN1 è stata localizzata nel rene in sede glomerulare e la sua presenza è stata

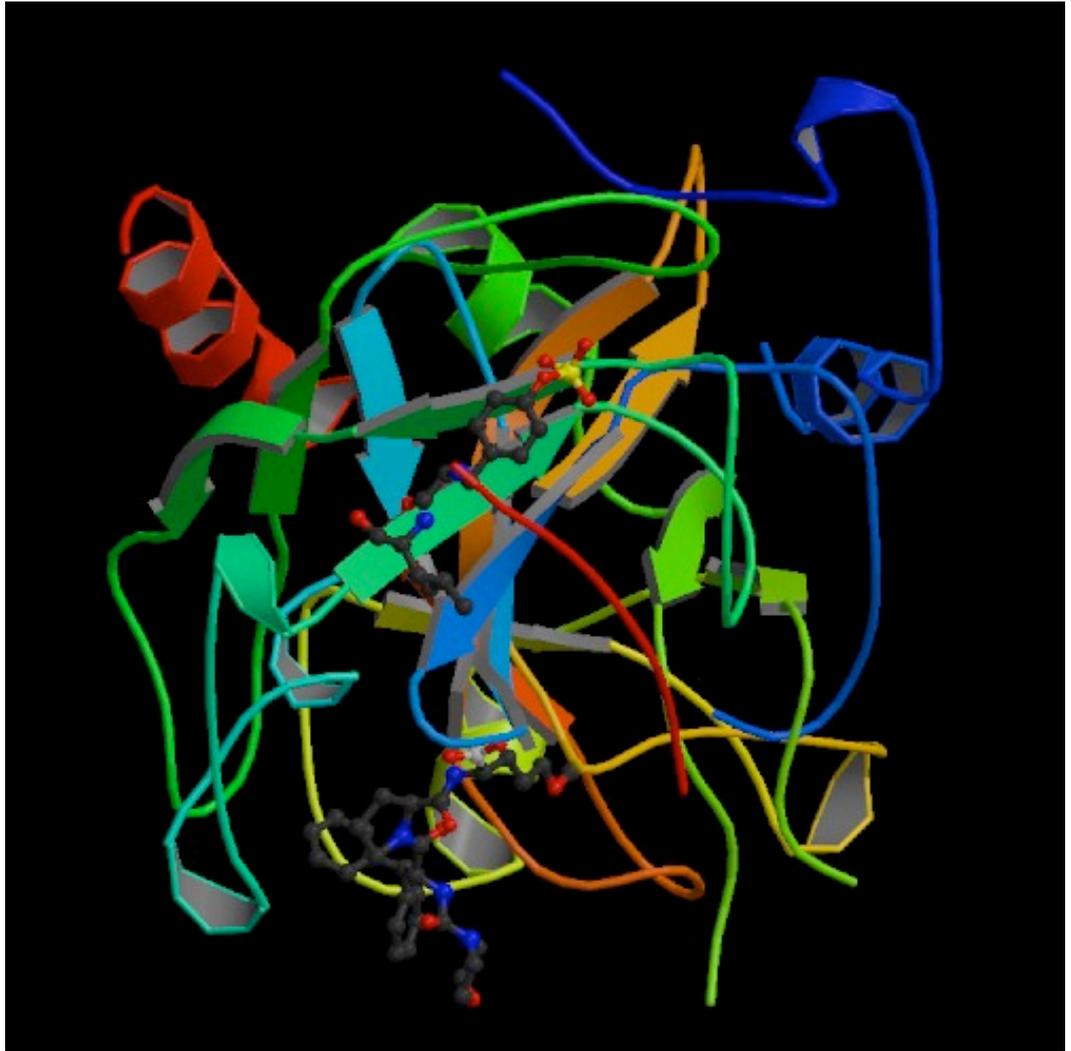
anche in questo caso correlata con la regolazione del processo emostatico (Moll et al., 1996).

### 1.3 La trombina

#### 1.3.1 Caratteristiche e funzioni

La trombina è una glicoproteina appartenente alla classe delle serin proteasi, essa è principalmente coinvolta nell'emostasi cellulare e nella coagulazione del sangue. Questa proteina viene prodotta come protrombina, a singola catena amminoacidica, dal fegato e viene immessa nel circolo sanguigno. Per la sua attivazione sono necessari tre tagli proteolitici: i primi due liberano due frammenti inattivi, il terzo separa la proteina in due catene A e B (Seegers, 1986). La  $\alpha$ -trombina, così formata, ha un peso molecolare di circa 33 kDa con la catena A costituita da 36 amminoacidi, la B da 259. Le due catene sono unite da un ponte disolfuro tra il residuo Cys<sup>1</sup> della prima e il residuo Cys<sup>122</sup> della seconda catena. L'enzima presenta anche altri tre ponti disolfuri localizzati tutti sulla catena B, che ha la struttura tipica delle serin proteasi (Bar-Shavit et al., 1984). Essa è caratterizzata da 5 strutture ad  $\alpha$ -elica, due foglietti  $\beta$ , costituiti ciascuno da sei nastri, e vari loop. La catena A invece è costituita da una piccola  $\alpha$ -elica, nella zona C-terminale, e vari loop (fig. 5).

La superficie della  $\alpha$ -trombina, come osservato da studi di diffrazione ai raggi X, mostra diverse fenditure e asperità responsabili probabilmente della varietà di funzioni biologiche mostrate dall'enzima. In fig. 5 è mostrata la struttura tridimensionale della trombina in cui sono evidenziati i tre residui catalitici (Ser<sup>195</sup>, His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup>) che si trovano all'interfaccia tra i due foglietti  $\beta$ . La struttura del sito catalitico è pressochè invariata in tutte le strutture di serin-proteasi note, esso è delimitato da un'ampia regione idrofobica, mentre l'ingresso a tale sito è delimitato da residui carichi



*Fig. 5* Struttura dell' $\alpha$ -trombina ricavata dalla diffrazione ai raggi X.

negativamente, come ad esempio Glu<sup>122</sup> e Asp<sup>189</sup>. La presenza di tali amminoacidi non è coinvolta nella formazione di ponti salini intramolecolari ma piuttosto nel riconoscimento di substrati ed inibitori. Sulla superficie dell'enzima sono inoltre presenti due esosti, entrambi composti prevalentemente da residui carichi positivamente. Uno di essi è essenziale per il riconoscimento del fibrinogeno, della trombomodulina e dell'inibitore naturale irudina; l'altro è coinvolto nel legame con l'eparina. Infatti tali molecole presentano regioni ricche di residui carichi negativamente (Schechter and Berger, 1967).

La funzione principale della trombina è la regolazione dell'emostasi, questo enzima è infatti in grado di indurre sia la coagulazione che la risposta anticoagulante. Nel primo caso trasforma il fibrinogeno in fibrina e attiva le piastrine, innescando la formazione del coagulo. Nel secondo caso, dopo l'interazione con la trombomodulina, attiva la proteina C che inattiva molti fattori che partecipano alla cascata coagulativa e porta anche alla diminuzione della produzione della trombina stessa (Seegers and Walz, 1986).

La trombina inoltre è regolata da alcune serpine, quali l'antitrombina III, e la PN1. La prima, presente nel plasma, in presenza di eparina forma un complesso con la trombina che viene successivamente degradato, regolando così, insieme alla proteina C, la quantità di trombina nel sangue e assicurando un'azione trombotica specifica e di durata limitata.

*In vitro* sono state osservate varie attività della trombina che non sono strettamente legate all'emostasi, quali un'attività proliferativa, per fibroblasti e monociti, chemotattica, per monociti e macrofagi, oltre ad un coinvolgimento nella differenziazione neuronale, come già accennato (Grabham and Cunningham, 1995). Queste attività suggeriscono un ruolo di questo enzima nel processo infiammatorio e nella rimarginazione delle ferite. Infatti la trombina che rimane intrappolata nel coagulo può diffondere verso il tessuto danneggiato senza entrare in contatto con i fattori presenti nel plasma che ne causerebbero l'inattivazione (Fenton, 1988).

Le attività della trombina, legate a tessuti diversi da quello sanguigno, sembrerebbero dipendere dall'attivazione di recettori specifici i PAR, in particolare PAR1, PAR3 e PAR4, che vengono attivati dal taglio proteolitico della trombina. Questi recettori sono associati a proteine G e sono coinvolti in una serie di processi quali la retrazione dei neuriti causata dalla trombina (Turgeon et al., 1998; Jalink et al., 1994) e lo sviluppo di cellule neuronali (Debeir et al., 1998). Infine recentemente è stato osservato un ruolo sia della trombina che del recettore PAR1 nella modulazione di espressione di alcune serpine (PAI-1 e PN1) in cellule della muscolatura liscia. In particolare la trombina tramite attivazione di PAR1 è in grado di down-regolare la produzione della PN1 (Richard et al., 2004) e indurre la produzione di PAI-1 (Noda-Heiny et al., 1993, Richard et al., 2004).



Capitolo 2

**Scopo del lavoro**

## 2.1 Modulazione dell'espressione di PN1

Come descritto nell'introduzione, la serpina PN1 ha un ruolo importante nello sviluppo e nell'omeostasi del sistema nervoso. Sebbene numerose evidenze dimostrino tale importanza, il meccanismo biologico che sta alla base dell'azione della PN1 non è ancora stato chiarito. Per poter disporre di sistemi sperimentali adatti a condurre l'analisi dei meccanismi molecolari alla base delle funzioni di PN1, sono stati messi a punto dei sistemi cellulari in grado di over-esprimere o silenziare la produzione di questa serpina.

Nel primo caso è stato utilizzato come modello sperimentale il sistema *tet-off* in cellule PC12. Mediante questo sistema è possibile indurre l'over-espressione della proteina di interesse e studiarne gli effetti sulle cellule. Le cellule scelte hanno la capacità di differenziarsi in cellule neuronali: è stato dunque possibile valutare morfologicamente gli effetti dell'over-espressione durante il differenziamento e il possibile coinvolgimento in tale processo della trombina.

Nel secondo caso, per ottenere il silenziamento genico della PN1, è stato utilizzato l'RNA *interference* in cellule C6. A questo scopo sono stati clonati nel plasmide pAVU6+27 vari tipi di oligonucleotidi, in grado di attivare il processo di RNA *interference*, a valle di un promotore per piccoli RNA. I plasmidi ottenuti, che contengono anche il gene per la resistenza alla neomicina, sono stati trasfettati in transiente nelle cellule C6. I lisati totali e l'mRNA totale sono stati analizzati per valutare l'efficienza dei vari costrutti di silenziare la produzione di mRNA e proteina per PN1.



Capitolo 3

# **Sistema sperimentale**

## 3.1 Il sistema per l'over-espressione inducibile

### 3.1.1 Le cellule PC12

La linea cellulare PC12, derivata da un feocromocitoma di ratto, è stata utilizzata come sistema modello per studiare il meccanismo molecolare dello sviluppo neuronale (Greene and Tischler, 1976). Il feocromocitoma è un tumore delle cellule cromoaffini del surrene, che si originano dalla cresta neurale, come i neuroni simpatici. In condizioni normali le PC12 mostrano il fenotipo caratteristico delle cellule cromoaffini con presenza di granuli cromoaffini, la sintesi, l'immagazzinamento e il rilascio di catecolammine (Greene and Tischler, 1976; Greene and Rein, 1977). Quando esposte all'azione del NGF, le PC12 si differenziano assumendo fenotipo neuronale con prolungamento dei neuriti, formazione delle vescicole sinaptiche ed eccitabilità elettrica (Greene and Tischler, 1976; Biales et al., 1976; Tischler and Greene, 1978). Queste cellule differenziate sono indistinguibili dai neuroni simpatici anche dal punto di vista biochimico, ma al contrario di questi ultimi non necessitano di un continuo apporto di NGF per la sopravvivenza (Greene and Rukenstein, 1981). Questo costituisce un vantaggio per lo studio *in vitro* del differenziamento neuronale.

### 3.1.2 Il sistema tet-off

Il sistema *tet-off* è stato utilizzato per la prima volta nel 1992 da Grossen and Bujard. Esso permette di regolare l'espressione genica mediante la rimozione della tetraciclina o della doxiciclina (un analogo della tetraciclina più stabile). Il sistema *tet-off* è stato ideato prendendo come modello l'operone del gene per la resistenza alla tetraciclina di *Escherichia coli*. In questo organismo il gene regolatore *tetR* produce una proteina (TetR) che blocca la trascrizione dei geni

per la resistenza alla tetraciclina mediante il legame all'operatore (*tetO*). Tale blocco avviene in assenza di tetraciclina, mentre quando l'antibiotico è presente, si lega a TetR inducendo un cambio conformazionale nella proteina e impedendole il legame con *tetO* (Hillen et al., 1982).

Nel sistema *tet-off* il primo componente cruciale è la proteina regolatrice: si tratta di una proteina di fusione in cui gli amminoacidi 1-207 di TetR sono legati a 127 amminoacidi della porzione C-terminale del dominio di attivazione VP16 di *Herpes simplex virus* (AD in fig. 6, Triezenberg et al., 1988). Il dominio VP16 converte TetR da repressore ad attivatore della trascrizione, questa proteina ibrida è conosciuta con il nome di transattivatore controllato dalla tetraciclina (tTA). Il gene per l'espressione di tTA è inserito nel plasmide regolatore pTet-Off, che contiene anche il gene per la resistenza alla neomicina, permettendo la selezione delle cellule stabilmente transfettate (nel nostro caso le cellule PC12). Il secondo componente cruciale è il plasmide pTRE: esso contiene l'elemento responsivo alla tetraciclina (TRE), che permette di controllare l'espressione del gene di interesse. Il TRE contiene 7 ripetizioni della sequenza di *tetO*, a monte del promotore minimo di *Citomegalovirus*, che manca degli elementi *enhancer*, in modo che non vi sia alcuna espressione del gene di interesse in assenza di legame di tTA con TRE. Il sistema è funzionale quando la linea cellulare contiene sia il pTet-Off sia il pTRE con il gene di interesse. Solo in questo caso infatti tTA può legare TRE e attivare la trascrizione in assenza di tetraciclina o doxiciclina (fig.6).

## 3.2 Il sistema per lo spegnimento

### 3.2.1 Le cellule C6

Le cellule C6, una linea cellulare derivata da glioma di ratto, sono state spesso utilizzate per studi di fattori e condizioni importanti

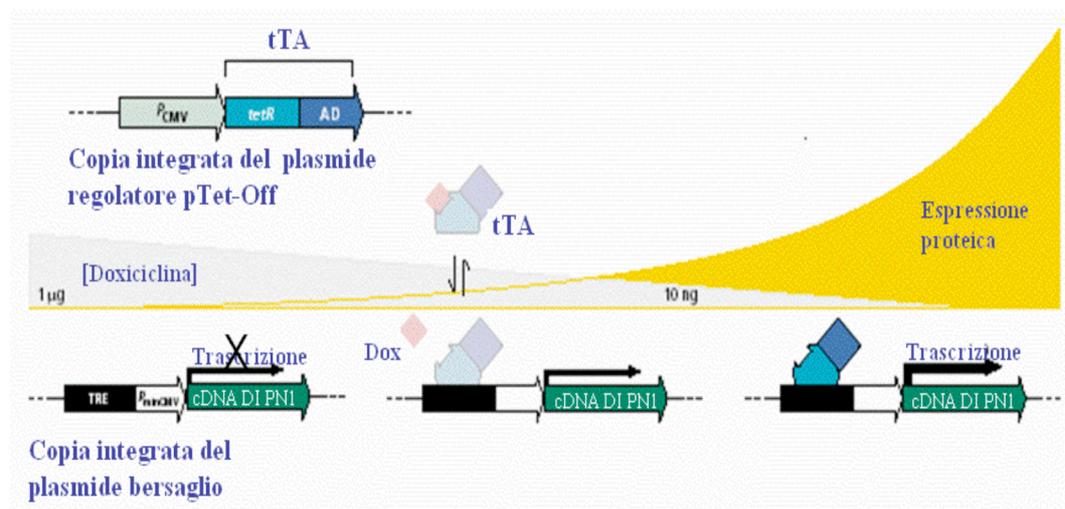


Fig. 6 Schema grafico del meccanismo del sistema tet-off.

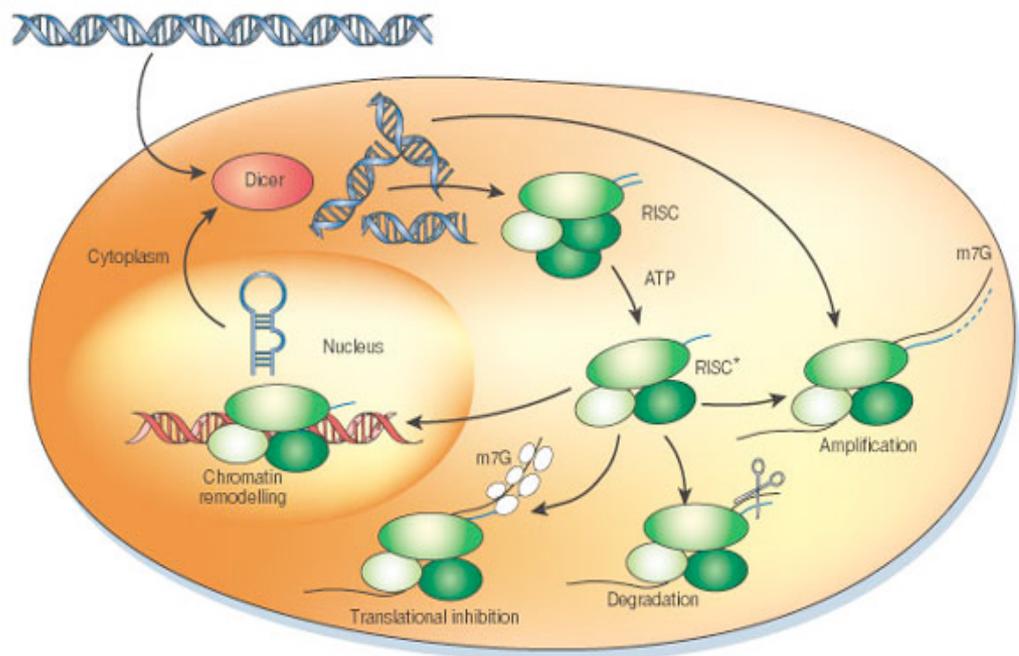
per lo sviluppo e il differenziamento delle cellule gliali (Mangoura et al., 1989). Una caratteristica di queste cellule è che l'espressione di alcuni geni varia con il numero di passaggi a cui sono state sottoposte (Parker et al., 1980). Nei primi passaggi, le C6 esprimono alti livelli di fosfoidrolasi di nucleotidi ciclici, un enzima marcatore degli oligodendrociti, e bassi livelli dell'enzima glutammina sintasi, marcatore degli astrociti, mentre ad un numero di passaggi elevato, questa situazione si capovolge. Le C6 possono essere indotte con vari trattamenti a generare fenotipo astrocitario (Vernadakis et al., 1991). I fattori responsabili di questo transdifferenziamento non sono ancora noti: risulta da chiarire se questo fenomeno sia dovuto ad una proprietà delle cellule gliali o ad un effetto di fattori relativi alla coltivazione *in vitro*. Recentemente è stata trovata una correlazione tra modificazione nell'ECM (*Extra Cellular Matrix*) e tasso di proliferazione cellulare nelle C6 (Mendes de Aguiar et al., 2002). In particolare, la desolforazione dei GAG porta ad una minore adesione di queste cellule, cambiamenti morfologici nonché ad una riduzione della proliferazione. Questi risultati fanno supporre un ruolo dei GAG nella progressione dei tumori dato che essi, interagendo con l'ECM, possono influenzare l'adesione e la morfologia cellulare (Mendes de Aguiar et al., 2002).

### 3.2.2 L'RNA interference

L'*RNA interference* (silenziamento genico dovuto alla presenza di RNA a doppio filamento) è un termine generico che indica una serie di fenomeni in cui molecole di RNA guidano la repressione di sequenze omologhe. Tali fenomeni sono comuni negli organismi eucariotici, infatti in un primo momento è stato descritto nelle piante come meccanismo di soppressione genica (van der Krol et al., 1988; Napoli et al., 1990; Matzke et al., 1991): l'introduzione in questi organismi di copie esogene di RNA portava a fenomeni di inattivazione genica

dovuta alla metilazione del gene omologo alla sequenza introdotta (Cogoni et al., 1996). Successivamente un fenomeno simile è stato riscontrato nel nematode *Caenorhabditis elegans* nel quale sono necessarie lunghe molecole di RNA a doppio filamento per l'induzione del silenziamento (Fire et al., 1998; Ketting et al., 2000).

Il pathway dell'*RNA interference* (fig. 7) prevede come primo passo che la molecola di RNA a doppio filamento venga tagliata dall'enzima Dicer, che appartiene alla famiglia delle RNAsi III, in piccoli pezzi di 21-28 nt (Bernstein et al., 2001). Successivamente questi piccoli RNA (chiamati siRNA da *small interfering RNA*) vengono reclutati dalla proteina argonauta che separa i due filamenti e induce la formazione del complesso enzimatico chiamato RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*) di cui essa stessa è parte integrante (Fagard et al., 2000; Hammond et al., 2000). A questo punto il RISC intercetta l'mRNA complementare al siRNA e induce il suo silenziamento mediante un taglio proteolitico. È stato inoltre visto che anche i microRNA (piccoli RNA, normalmente prodotti dalla cellula, formati da un tratto di 20-22 nt a doppio filamento, detto *stem*, e un tratto a singolo filamento di 8-9 nt, il *loop*) sono in grado di essere reclutati dalla proteina argonauta e indurre il silenziamento, attivando il RISC. In questo caso, oltre al taglio proteolitico dell'mRNA bersaglio, si verifica anche il blocco della trascrizione. Anche l'RdRP (*RNA-dependent RNA polimerase*) è implicato nel meccanismo di *RNA interference*. Questa polimerasi amplifica l'effetto del *RNA interference* generando altri siRNA, utilizzando come stampo l'RNA a singolo filamento contenuto nel RISC (Almeida and Allshire, 2005). Questo meccanismo di *feed-back* positivo è importante nei nematodi, nelle piante e nei funghi, per permettere l'amplificazione del segnale prodotto dallo siRNA e far sì che l'effetto si propaghi in maniera sistematica nell'intero organismo (Palauqui et al., 1997; Vaistij et al., 2002). Tale fenomeno comunque non è stato osservato né in *Drosophila* né nei vertebrati. Dallo studio del *RNA interference* si è potuto evidenziare che tale meccanismo svolge un ruolo importante in



*Fig. 7* Rappresentazione schematica del meccanismo di azione dell'RNA interference.

diversi processi cellulari. È infatti implicato non solo nella protezione contro virus e trasposoni, ma anche nella regolazione genica e nella modificazione della struttura cromatinica (Almeida and Allshire, 2005). Il meccanismo dell'RNA *interference* è diventato un potente strumento per lo studio della funzione genica. In particolar modo in *Caenorhabditis elegans*, per il quale sono stati analizzati mediante RNA *interference* la maggior parte dei geni identificati (Poulin et al., 2004), e per le piante nelle quali tale metodica ha dato ottimi risultati (Baulcombe, 2004). Nei mammiferi è stato più difficile utilizzare l'RNA *interference*, infatti tali organismi rispondono alla presenza di RNA a doppio filamento con il blocco totale della trascrizione, attivando PKR (protein-chinasi RNA-dipendente, Gil and Esteban, 2000). Per ovviare a questo problema sono stati utilizzati siRNA sintetici (Elbashir et al., 2001), che mimano i prodotti di degradazione della Dicer e sono troppo piccoli per attivare PKR, e shRNA (short hairpin RNA) costruiti prendendo come modello i microRNA. In particolare gli shRNA sono utili per poter effettuare un silenziamento genico sistematico. Gli shRNA possono essere espressi *in vivo* in cellule eucariotiche con vettori di espressione che contengono il promotore della RNA polimerasi III, inducendo una soppressione stabile del gene bersaglio (Paddison et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002; Sui et al., 2002).



Capitolo 4

# **Materiali e metodi**

## 4.1 Linee cellulari

Linea	Origine	Organo	Referenza
PC12	<i>Rattus norvegicus</i>	Surrene, feocromocitoma.	Greene and Tischler, 1976
PC12 tet-off	<i>Rattus norvegicus</i>	Surrene, feocromocitoma. Plasmide regolatore tTa integrato nel genoma.	Grossen and Bujard, 1992
C6	<i>Rattus norvegicus</i>	Cervello, glioma.	Benda et al, 1968

## 4.2 Terreni e condizioni di crescita

### 4.2.1 Terreni di crescita

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (ICN).

Per le C6 al DMEM sono stati aggiunti FBS (Fetal Bovine Serum, ICN) al 10%, L-glutamina 10mM, penicillina e streptomycin 5mM.

Per le PC12 al DMEM sono stati aggiunti Horse Serum (scomplementato per 20 minuti a 55°C) al 10%, FBS al 5%, L-glutamina 10mM, penicillina e streptomycin 5mM. Per le PC12 *tet-off* al mezzo per le PC12 è stato aggiunto l'antibiotico G418 (Gibco) in concentrazione 100µg/ml.

### 4.2.2 Condizioni di crescita

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state cresciute in un incubatore umidificato a 37°C in presenza di CO<sub>2</sub> 5%.

#### 4.2.3 Transfezione stabile di cellule PC12 *tet-off*

La transfezione è stata effettuata utilizzando cellule PC12 *tet-off* in crescita logaritmica, piastrate in piastre per colture cellulari di diametro 60mm in modo da avere una confluenza del 90%. La transfezione è avvenuta in terreno DMEM privo di siero e di antibiotici.

Sono state preparate due soluzioni:

1. 500 $\mu$ l di DMEM con aggiunta di 20 $\mu$ l di Lipofectamina 2000 (Invitrogen),
2. 500 $\mu$ l di DMEM con aggiunta di 8 $\mu$ g di DNA plasmidico (pTRE-RBS/PN1 e pTKHygro in rapporto 20:1).

Le due soluzioni sono state incubate 5 minuti a temperatura ambiente quindi sono state unite e la miscela incubata 30 minuti a temperatura ambiente. Trascorso il tempo di incubazione, la miscela DNA/Lipofectamina è stata aggiunta alle cellule in coltura. Le cellule sono state quindi incubate per 16 ore in incubatore umidificato a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Passato questo periodo la soluzione di transfezione è stata rimossa ed è stato aggiunto il normale terreno di crescita.

Per la produzione dei cloni stabili, a 48 ore dalla transfezione le cellule sono state selezionate mediante aggiunta di igromicina B (MPBiomedical) in concentrazione 1mg/ml. Le cellule resistenti all'antibiotico hanno formato dei cloni che sono stati isolati ed amplificati. Dopo circa tre settimane la concentrazione dell'igromicina B è stata diminuita a 0.5mg/ml per il mantenimento dei cloni in coltura ed è stata aggiunta doxiciclina in concentrazione 10ng/ml per tenere spento il sistema *tet-off*.

#### 4.2.4 Transfezione transiente di cellule C6

La transfezione è stata effettuata utilizzando cellule C6 in crescita logaritmica, piastrate in piastre per colture cellulari di

diametro 60mm in modo da avere una confluenza del 60-70%. La transfezione è avvenuta in terreno DMEM privo di siero e di antibiotici.

Sono state preparate due soluzioni:

3. 500 $\mu$ l di DMEM con aggiunta di 20 $\mu$ l di Lipofectamina 2000 (Invitrogen),
4. 500 $\mu$ l di DMEM con aggiunta di 4 $\mu$ g di DNA plasmidico.

Le due soluzioni sono state incubate 5 minuti a temperatura ambiente quindi sono state unite e la miscela incubata 30 minuti a temperatura ambiente. Trascorso il tempo di incubazione, la miscela DNA/Lipofectamina è stata aggiunta alle cellule in coltura. Le cellule sono state quindi incubate per 16 ore in incubatore umidificato a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Passato questo periodo, la soluzione di transfezione è stata rimossa ed è stato aggiunto il normale terreno di crescita.

A 48 ore dalla transfezione le cellule sono state raccolte ed analizzate.

### 4.3 Ceppi batterici e condizioni di crescita

Ceppo	Genotipo	Referenza
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F' /endA1 hsd R17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) gln V44 thi <sup>-</sup> 1 recA1 gyrA (Nal <sup>R</sup> ) rel A1 $\Delta$ (lac IZYA <sup>-</sup> arg F) V 169 deoR ( $\phi$ 80 d lac $\Delta$ (lac Z M15))	Woodcock et al., 1989

#### 4.3.1 Terreni di coltura e condizioni di crescita

TY: triptone 10 g, estratto di lievito 5 g, cloruro di sodio 5 g in un volume finale di 1 litro.

Per selezionare i ceppi trasformati di *E. coli* sono stati usati ampicillina (100  $\mu$ g/ml), canamicina (30  $\mu$ g/ml).

I ceppi di *E. coli* sono stati cresciuti a 37°C. Le colture liquide sono state cresciute a in condizione di costante agitazione.

## 4.4 Analisi del DNA batterico

### 4.4.1 Preparazione del DNA plasmidico da *E. coli*

La preparazione del DNA batterico (mini e maxi prep), l'analisi del DNA con enzimi di restrizione e gel di agarosio sono stati condotti come descritto in *Molecular cloning a laboratory manual* (seconda edizione, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989). Sono stati utilizzati gel allo 0.8% di agarosio per frammenti da 13Kb a 5Kb e allo 1.0% di agarosio per frammenti da 5Kb a 1Kb. Gli enzimi di restrizione sono stati forniti da Roche e Biolabs, come indicatore di peso molecolare è stato utilizzato 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen).

### 4.4.2 Sequenziamento del DNA

L'analisi per sequenziamento del DNA plasmidico è servita a verificare i clonaggi effettuati. Per sequenziare i plasmidi è stato utilizzato il servizio di sequenziamento del CEINGE Biotecnologie Avanzate.

## 4.5 Descrizione dei plasmidi

### 4.5.1 Vettore *pTRE-RBS/PN1*

Vettore bersaglio del sistema *tet-off* di circa 4Kb. È presente il promotore  $TRE_{mod}/minCMVD$  (inducibile) a valle del quale è stato clonato il Ribosome Binding Site (RBS) nel sito unico di restrizione EcoRI. Il cDNA della PN1 è stato isolato, mediante reazione di RT-PCR, da campioni di RNA totale estratti da cervello di *Rattus norvegicus*: il sistema nervoso centrale è uno dei distretti anatomici con la maggiore

espressione di questa serpina (Eaton and Baker, 1983; Gloor et al., 1986). Gli oligonucleotidi per la reazione di PCR sono stati costruiti con i siti di taglio SacI e KpnI. Il cDNA di PN1, di circa 1400bp ottenuto per RT-PCR, è stato clonato a valle del RBS nel vettore opportunamente linearizzato. Il cDNA di PN1 clonato è stato controllato tramite sequenziamento, la sequenza ottenuta concorda con quella descritta in letteratura, tranne per il residuo 319 che è una Valina anzichè una Leucina (Sommer et al., 1987). Il vettore possiede origine di replicazione OriC e la cassetta per la resistenza all'ampicillina.

#### 4.5.2 Vettore pTKHygro

Vettore per la selezione in cellule eucariotiche di 5.1Kb. E' presente la cassetta della resistenza all'igromicina controllata dal promotore costitutivo di *Herpes simplex virus* (SV40). L'antibiotico per il quale è selezionabile in *E. coli* è l'ampicillina, origine di replicazione OriC.

#### 4.5.3 Vettore pAVU6+27

Vettore per l'espressione di piccoli RNA in cellule eucariotiche di 6.1Kb. È presente la cassetta del promotore U6 umano contenente la sequenza per un *small nuclear* RNA. È selezionabile in cellule eucariotiche con l'antibiotico G418 e in *E. coli* con ampicillina e canamicina. Origine di replicazione OriC.

#### 4.5.4 Vettore pAVU6RNAi

Nel vettore pAVU6+27 sono state clonate le sequenze per quattro shRNA dirette contro l'mRNA di PN1 e una sequenza random nei siti di restrizione Sall e XbaI. Sono stati così creati i plasmidi pRNAi1, pRNAi2, pRNAi3, pRNAi4, pRNAi/Random.

## 4.6 Analisi di RNA da cellule eucariotiche

### 4.6.1 Estrazione di RNA e analisi mediante northern blot

Per l'estrazione di RNA totale da cellule eucariotiche e l'analisi mediante *northern blot* sono stati seguiti i protocolli descritti in *Molecular cloning a laboratory manual* (seconda edizione, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

### 4.6.2 RT-PCR semiquantitativa

Per ottenere il cDNA di PN1 10 $\mu$ g di RNA totale sono stati sottoposti a reazione di RT. La miscela di reazione è così composta 10 $\mu$ g di RNA totale, 2pmoli dell'oligonucleotide "reverse" per PN1, 0.5mM della mix di dNTP, *buffer* 1x (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, MgCl<sub>2</sub> 3mM), DTT 10mM, Super Script II RT (Invitrogen) 400 unità. Per ottenere il cDNA di  $\beta$ -actina 5 $\mu$ g di RNA totale sono stati sottoposti a reazione di RT. La miscela di reazione è così composta: 5 $\mu$ g di RNA totale, 2pmoli dell'oligonucleotide "reverse" per  $\beta$ -actina, 0.5mM della mix di dNTP, *buffer* 1x (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, MgCl<sub>2</sub> 3mM), DTT 10mM, Super Script II RT (Invitrogen) 200 unità. Per far avvenire la reazione è stata dapprima preparata una mix contenente l'RNA, gli oligonucleotidi e i dNTP, che è stata incubata 5 minuti a 65°C per permettere l'appaiamento degli oligonucleotidi all'RNA. Quindi sono stati aggiunti il *buffer*, il DTT e Super Script II RT (Invitrogen), la miscela è stata a questo punto incubata per 1 ora e 30 minuti a 42°C. l'enzima è stato poi inattivato a 70°C per 15 minuti.

Per valutare l'espressione di PN1 il cDNA (circa 2 $\mu$ g) ottenuto dalla reazione di RT è risospeso in una soluzione 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, tampone 1x (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH8.4), 0.2 mM dNTP e Taq polimerasi 2.5 unità. Alla miscela sono stati aggiunti gli opportuni oligonucleotidi (oligo) di 20 basi ad una concentrazione 0.5 mM. Gli

oligo usati per l'amplificazione di un frammento di 800bp del cDNA di PN1 sono stati:

Forward:

5'-AACTCTCTGTCACCTCGAGGA-3'

Reverse:

5'-TGTCGGATGCAGAACAGGAA-3'

La temperatura di *annealing* per i due primer è 58°C mentre il numero di cicli per ottenere un'amplificazione in fase esponenziale è 35. Per cui le varie fasi della PCR sono state così programmate:

1° ciclo:

5 minuti 95°C Denaturazione del DNA

2°-34° ciclo:

1 minuto 95°C Denaturazione del DNA

1 minuto 58°C Appaiamento del DNA con gli oligo

2 minuti 72°C Polimerizzazione

35° ciclo:

5 minuti 72°C Completamento della sintesi delle eliche del DNA amplificato

Per valutare l'espressione di  $\beta$ -actina, il cDNA (circa 0.5 $\mu$ g) ottenuto dalla reazione di RT è risospeso in una soluzione 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, tampone 1x (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH8.4), 0.2 mM dNTP e Taq polimerasi 2.5 unità. Alla miscela sono stati aggiunti gli opportuni oligonucleotidi (oligo) di 18 basi ad una concentrazione 0.5 mM. Gli oligo usati per l'amplificazione di un frammento di 700bp del cDNA di  $\beta$ -actina sono stati:

Forward:

5'-GGCACCACCTTCTACA-3'

Reverse:

5'-CAGGAGGAGCAATGATCT-3'

La temperatura di *annealing* per i due primer è 52°C mentre il numero di cicli per ottenere un'amplificazione in fase esponenziale è 20. Per cui le varie fasi della PCR sono state così programmate:

1° ciclo:

5 minuti 95°C Denaturazione del DNA

2°-19° ciclo:

1 minuto 95°C Denaturazione del DNA

1 minuto 52°C Appaiamento del DNA con gli oligo

1 minuto 72°C Polimerizzazione

20° ciclo:

5 minuti 72°C Completamento della sintesi delle eliche del DNA amplificato

I campioni ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1% in tampone TAE 1x e analizzati mediante il programma *Quantity One* (BIO-RAD).

## 4.7 Analisi di proteine

### 4.7.1 Preparazione di lisati

Alle cellule cresciute in monostrato è stato eliminato il mezzo di crescita ed è stata aggiunta la soluzione di lisi preraffreddata a 4°C. Tale soluzione è composta da Hepes 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, EGTA 5mM, glicerolo 1%, triton X-100 1%. Le cellule sono state incubate a 4°C per 20 minuti, a questo punto sono state prelevate e trasferite in eppendorf (1.5ml/tubo). I lisati sono stati centrifugati per 15 minuti a 13000 rpm a 4°C. il sovrnatante è stato recuperato e conservato per le successive analisi.

### 4.7.2 Determinazione della concentrazione proteica

Per la determinazione della concentrazione proteica dei lisati è stato usato il reagente *BIO-RAD protein assay* (BIO-RAD). Le determinazioni spettrofotometriche, effettuate a 595nm, sono riferite

ad una retta di taratura costruita utilizzando come standard l'albumina da siero bovina (BSA), saggiata in quantità da 1 a 12 $\mu$ g.

#### 4.7.3 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

L'elettroforesi delle proteina è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli (1970) utilizzando come riferimento una miscela di proteine a peso molecolare noto (*High Range Rainbow Molecular Weight Markers*, Amersham). I campioni proteici sono stati disciolti in una soluzione di Tris-HCl 125mM pH 6.8, SDS 2%, glicerolo 10%, blu di bromofenolo 0.02% e  $\beta$ -mercaptoetanololo 5% e sottoposti ad ebollizione per 5 minuti. I campioni sono stati quindi caricati su gel al 12% e la corsa è stata effettuata ad un amperaggio costante fino alla fuoriuscita del colorante dal gel.

#### 4.7.4 Western blot

Dopo la separazione le proteine sono state trasferite mediante elettroblot (Towbin et al.1979) su un filtro di nitrocellulosa (Schleicher and Schuell). Il filtro è stato quindi immerso in una soluzione di PBS (NaCl 0,14M, Buffer PO<sub>4</sub> 0,01M, KCl 0,003M) contenente latte in polvere al 5% e mantenuto sotto costante agitazione a 4°C per 16 ore.

L'immunorivelazione di PN1 è stata eseguita utilizzando come anticorpo primario l'anticorpo policlonale di coniglio, da noi prodotto, diluito 1:2000 in una soluzione di PBS contenente latte in polvere al 5%. L'ibridazione è stata condotta per 1 ora a temperatura ambiente, il filtro è stato quindi lavato con PBS contenente Triton X-100 allo 0.1%. Come anticorpo secondario sono state usate immunoglobuline anti coniglio prodotte in asino coniugate a perossidasi di rafano (Amersham). L'anticorpo secondario è stato diluito 1:2000 in una soluzione di PBS contenente latte in polvere al 5%. L'ibridazione è

stata condotta per 1 ora a temperatura ambiente, il filtro è stato quindi lavato con PBS contenente Triton X-100 allo 0.1% e con Tris-HCl 50mM pH 7.5.

L'immunorivelazione di l7a è stata eseguita utilizzando come anticorpo primario l'anticorpo policlonale di coniglio, da noi prodotto, diluito 1:2000 in una soluzione di PBS contenente latte in polvere al 5%. L'ibridazione è stata condotta per 1 ora a temperatura ambiente, il filtro è stato quindi lavato con PBS contenente Triton X-100 allo 0.1%. Come anticorpo secondario sono state usate immunoglobuline anti-coniglio prodotte in asino coniugate a perossidasi di rafano (Amersham). L'anticorpo secondario è stato diluito 1:2000 in una soluzione di PBS contenente latte in polvere al 5%. L'ibridazione è stata condotta per 1 ora a temperatura ambiente, il filtro è stato quindi lavato con PBS contenente Triton X-100 allo 0.1% e con Tris-HCl 50mM pH 7.5.

L'immunorivelazione di  $\beta$ -actina è stata eseguita utilizzando come anticorpo primario l'anticorpo monoclonale di topo (Sigma) diluito 1:5000 in una soluzione di PBS contenente latte in polvere al 5%. L'ibridazione è stata condotta per 1 ora a temperatura ambiente, il filtro è stato quindi lavato con PBS contenente Triton X-100 allo 0.1%. Come anticorpo secondario sono state usate immunoglobuline anti-topo prodotte in asino coniugate a perossidasi di rafano (Amersham). L'anticorpo secondario è stato diluito 1:2000 in una soluzione di PBS contenente latte in polvere al 5%. L'ibridazione è stata condotta per 1 ora a temperatura ambiente, il filtro è stato quindi lavato con PBS contenente Triton X-100 allo 0.1% e con Tris-HCl 50mM pH 7.5.

Le proteine riconosciute in maniera specifica sono state rivelate mediante chemiluminescenza aggiungendo al filtro una soluzione contenente luminolo, substrato della perossidasi di rafano (ECL, Amersham). La chemiluminescenza sviluppata è stata rilevata per autoradiografia.



Capitolo 5

# **Risultati e discussione**

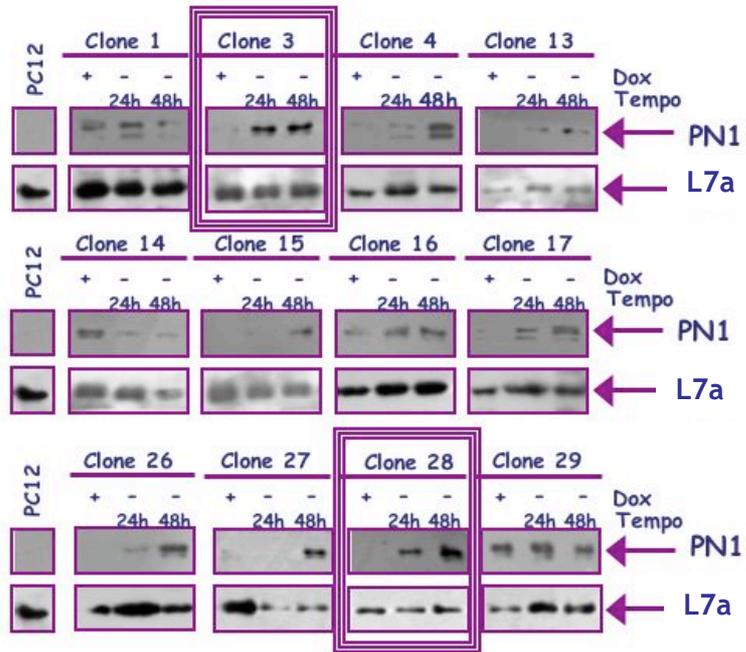
## 5.1 Over-espressione della PN1

### 5.1.1 Isolamento e analisi di cloni stabili di PC12 tet-off

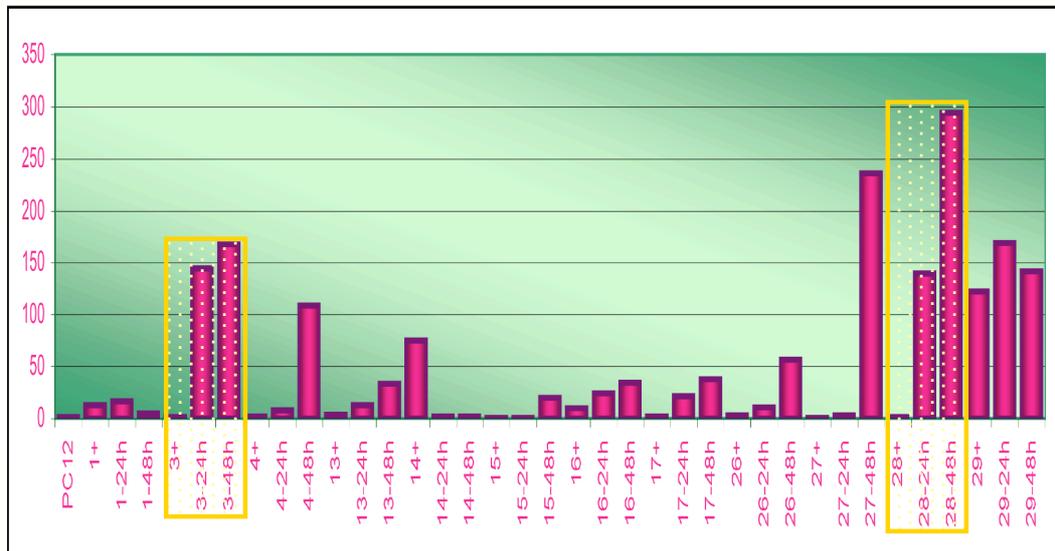
Le cellule PC12 *tet-off*, disponibili commercialmente (Clontech), sono in grado di esprimere la proteina regolatrice tTA (vedi § 3.1.2), infatti hanno integrato nel loro genoma il transgene di fusione che ne permette l'espressione costitutiva. Perché il sistema funzioni è necessario transfettare in queste cellule il plasmide bersaglio che contiene TRE (vedi § 3.1.2) e il cDNA del gene di interesse: tale plasmide, descritto nel paragrafo 4.5.3, è pTRE-RBS/PN1. Le cellule PC12 *tet-off* sono state cotransfettate mediante il metodo della lipofezione (lipofectamina 2000, Invitrogen) con il plasmide pTRE-RBS/PN1 e il plasmide pTKHygro in rapporto 20:1. Grazie alla presenza del gene per la resistenza all'igromicina presente nel plasmide pTKHygro, è stato possibile isolare e amplificare i cloni stabili, mediante aggiunta di terreno di coltura selettivo alle cellule transfettate. Si è proceduto quindi all'analisi per verificare l'efficienza del sistema di induzione. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari totali di cellule non indotte, in presenza di 10ng/ml di doxibicilina, e indotte, in presenza di mezzo completo privo di doxibicilina, per 24 e 48 ore. 15 µg di lisati per ogni campione sono stati utilizzati per effettuare analisi mediante *western blot* (fig. 8).

Nella prima colonna della fig. 8A sono mostrati i pannelli relativi a *western blot* di controllo su lisati totali di PC12 coltivate in mezzo privo di doxibicilina, la PN1 non è rilevabile. I pannelli successivi mostrano *western blot* su lisati totali di alcuni dei cloni isolati. Per ogni clone sono stati preparati tre campioni relativi a condizioni diverse di crescita. Il primo campione è stato preparato da cellule coltivate in presenza di doxibicilina, cioè in assenza di induzione. Il secondo e terzo campione sono stati preparati in assenza di doxibicilina a 24 e 48h, ovvero in caso di over-espressione di PN1. Gli anticorpi utilizzati sono stati siero totale di coniglio anti PN1

A

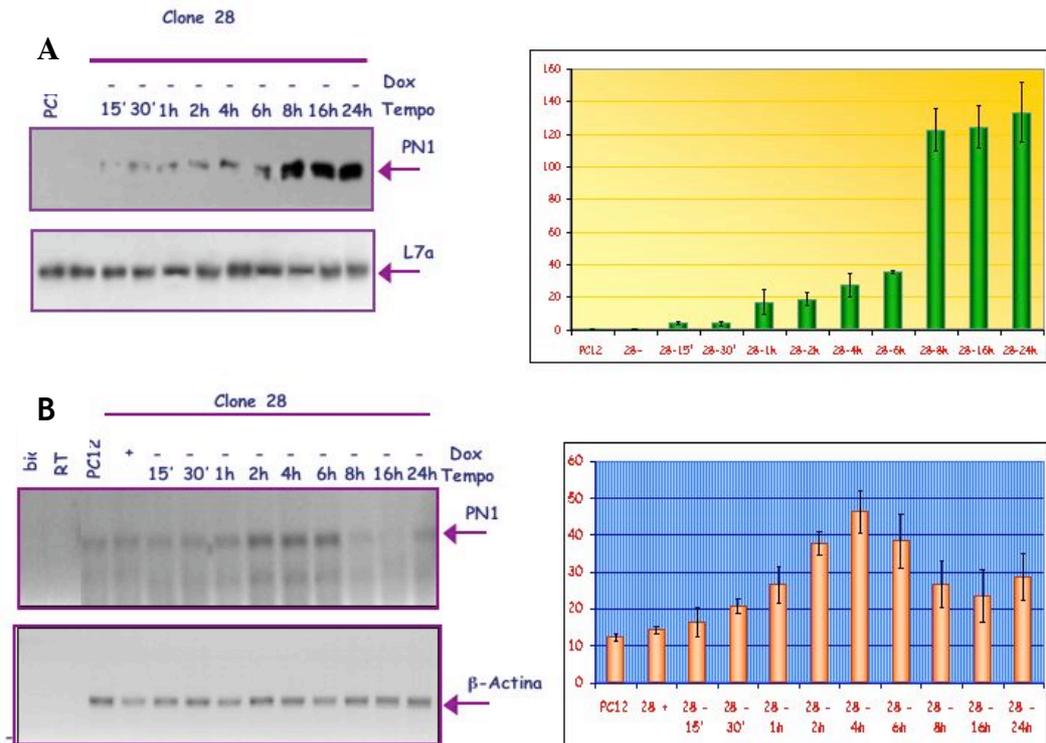


B



**Fig.8** Nel riquadro A sono mostrati i risultati dei western sui lisati totali dei vari cloni. Nel riquadro B è raffigurato l'istogramma relativo alle quantizzazioni dei western mostrati nel riquadro A.

(*home made*), per visualizzare l'over-espressione di PN1, e siero totale di coniglio anti l7a (*home made*), per normalizzare i risultati. Le diverse condizioni utilizzate sono utili per verificare sia l'effettiva over-espressione della PN1, sia l'efficienza dell'induzione del sistema. Come si può notare molti dei campioni analizzati mostrano un'efficiente induzione, in particolare il clone 3 e il clone 28, evidenziati dal riquadro, mostrano la migliore efficienza. In fig. 8B è raffigurato l'istogramma relativo alle quantizzazioni sui *western* della fig. 8A, effettuate mediante il programma *NIHImage*. Sull'asse delle ascisse sono riportati i vari campioni analizzati, sull'asse delle ordinate sono riportati i valori arbitrari espressi in percentuale delle quantizzazioni, opportunamente normalizzati. Sono evidenziati dai riquadri in giallo le quantizzazioni relative al clone 3 e al clone 28, che mostrano un'efficiente over-espressione e la migliore induzione del sistema. Sebbene per il clone 27 si abbia una maggiore over-espressione della PN1, rispetto al clone 3, l'induzione non è lineare rispetto al tempo per questo motivo è stato ritenuto più opportuno scegliere il clone 3 insieme al clone 28 per i successivi esperimenti. In particolare il clone 28 è stato utilizzato per analizzare l'aumento sia di proteina sia di mRNA per PN1 nel tempo (fig. 9). Per l'analisi di espressione proteica (fig.9A) è stato effettuato un *western blot* su lisati totali di cellule indotte e non indotte a diversi tempi da 15 minuti a 24 ore. Gli anticorpi utilizzati sono stati siero totale di coniglio anti PN1, per visualizzare l'over-espressione di PN1, e siero totale di coniglio anti l7a, per normalizzare i risultati. A destra del riquadro A è mostrato l'istogramma relativo alle quantizzazioni di tre esperimenti indipendenti di *western blot*. Sull'asse delle ascisse sono rappresentati i vari campioni, sull'asse delle ordinate sono rappresentati i valori arbitrari delle quantizzazioni, ottenuti mediante l'utilizzo del programma *NIHImage*, espressi in percentuale e opportunamente normalizzati. Come si vede l'aumento di espressione di PN1 è lineare nel tempo fino a 24 ore. Il massimo di espressione si



**Fig.9** Nel riquadro A sono mostrati i risultati dei western sui lisati totali del clone 28 prelevati a vari tempi dall'induzione. Alla destra del riquadro è mostrato l'istogramma relativo alla quantizzazione di tre esperimenti indipendenti. Nel riquadro B sono mostrati i risultati dell'RT-PCR semiquantitativa condotta su campioni di RNA totale del clone 28 estratti a vari tempi dall'induzione. Alla destra del riquadro è mostrato l'istogramma relativo alla quantizzazione di tre esperimenti indipendenti.

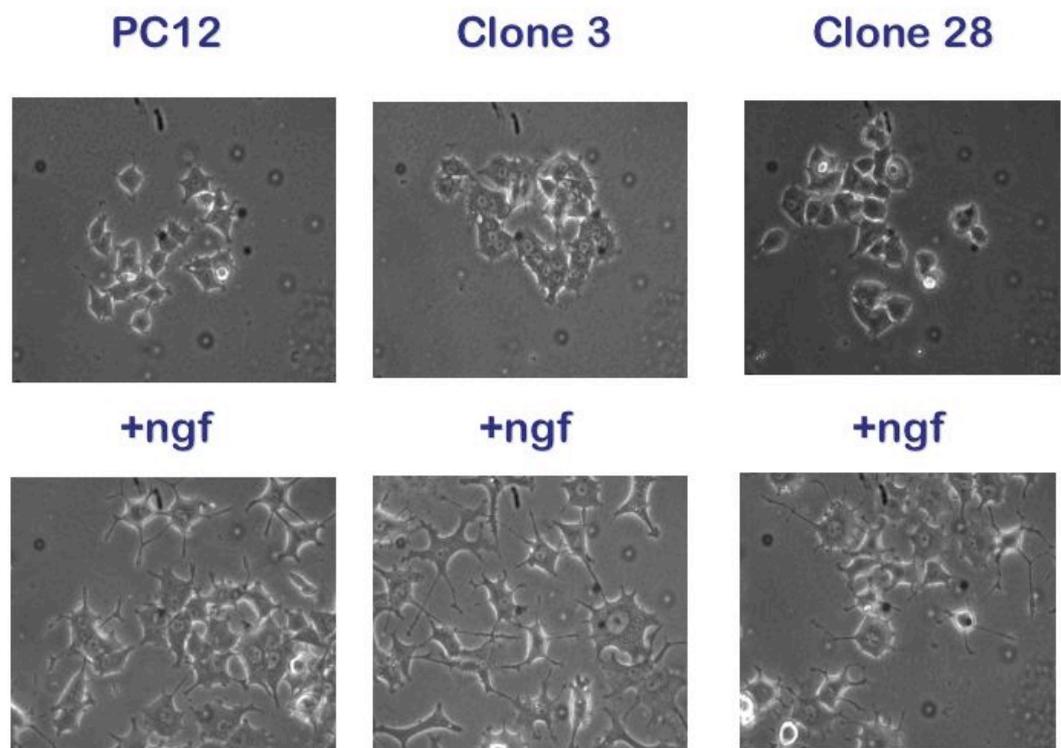
ha a 48 ore in base ai risultati ottenuti nell'esperimento mostrato in fig. 8.

Per l'analisi di espressione dell'mRNA (fig. 9B) è stato effettuato un esperimento di RT-PCR semiquantitativa, estraendo RNA totale da cellule indotte e non indotte a vari tempi partendo da 15 minuti ed arrivando a 24 ore. L'amplificazione di cDNA è stata effettuata usando opportuni oligonucleotidi sia per PN1 sia per  $\beta$ -actina, utilizzata come controllo. Dall'istogramma relativo alle quantizzazioni di tre esperimenti indipendenti (fig. 9B) si vede che si ha un massimo di espressione tra le 4 e le 6 ore. A partire dalle 8 ore è visibile una diminuzione di espressione che potrebbe essere dovuta ad una autoregolazione del gene, tale regolazione comunque non impedisce alla proteina di accumularsi (fig. 9A), inoltre l'espressione dell'mRNA nei campioni indotti è sempre superiore al controllo (+ doxiciclina) e comincia di nuovo ad aumentare dalle 24 ore (fig 9B).

### 5.1.2 Analisi del differenziamento

Una volta verificate l'effettiva over-espressione della PN1 e l'inducibilità del sistema, è stata analizzata la morfologia delle PC12 *wild type*, del clone 3 e del clone 28 in assenza di induzione. L'analisi morfologica è stata condotta sia in condizioni normali di crescita, sia in presenza di NGF dopo il differenziamento. Tale analisi è servita a valutare se ci fossero differenze nei vari tipi cellulari indipendenti dall'over-espressione di PN1. Come si può vedere dalla fig. 10 non sono rilevabili differenze sostanziali nella morfologia dei vari tipi cellulari sia in condizioni di crescita normali, sia in seguito al differenziamento indotto dall'aggiunta di NGF.

Come dimostrato dagli esperimenti preliminari fin qui descritti è possibile analizzare l'effetto dell'overespressione della PN1 durante il differenziamento di cellule PC12 *wild type*, di cellule del clone 3 e del clone 28. Le cellule sono state analizzate in varie condizioni di crescita:



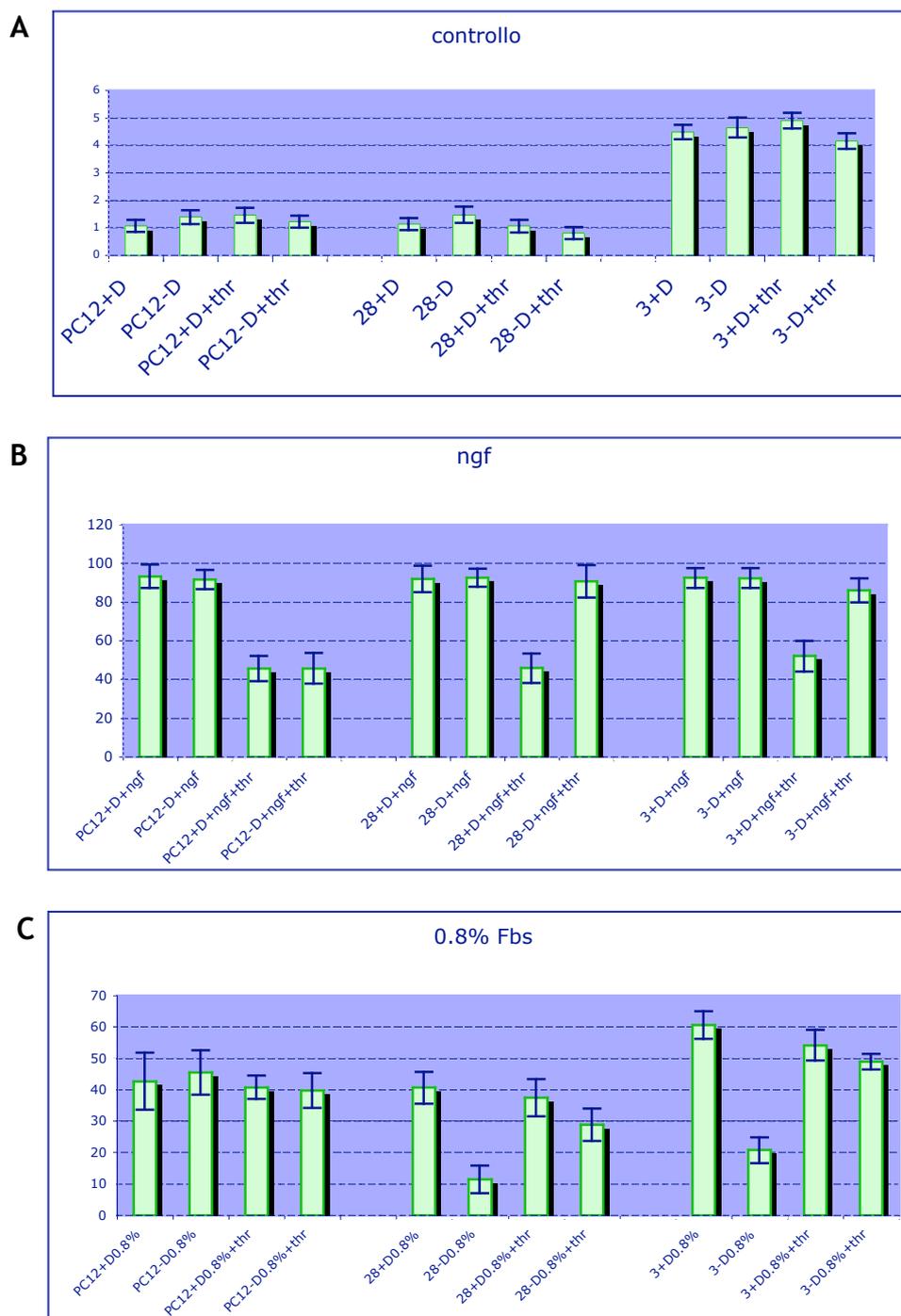
*Fig.10* Immagini al microscopio in contrasto di fase di cellule PC12, clone 3 e clone 28. I pannelli in alto mostrano le cellule in condizioni normali di crescita, i pannelli in basso mostrano le cellule differenziate mediante aggiunta al mezzo di coltura di NGF.

1. controllo, ovvero in presenza di mezzo completo;
2. indotte al differenziamento mediante aggiunta di NGF 50 $\mu$ g/ml;
3. indotte al differenziamento mediante deprivazione di siero (mezzo con aggiunta di 0,8% di Fetal Bovine Serum).

In ognuna di queste condizioni è stata analizzata la presenza o assenza di doxiciclina, per valutare l'effetto dell'over-espressione di PN1, e la presenza o assenza di trombina (concentrazione 10nM), per verificare l'effetto di questa proteasi sul differenziamento e la capacità da parte della PN1 di inibirla. In fig. 11 sono riportati gli istogrammi relativi alle osservazioni al microscopio dei tipi cellulari analizzati nelle tre condizioni descritte in questo paragrafo. Sull'asse delle ascisse sono riportati i vari campioni analizzati; sull'asse delle ordinate è riportato il rapporto tra cellule differenziate e cellule indifferenziate espresso in percentuale. Le cellule trattate sono state osservate dopo una settimana al microscopio invertito in contrasto di fase. L'osservazione è consistita nel contare il numero di cellule differenziate e di cellule totali in quattro inquadrature diverse per ogni piastra, in modo da osservare un numero di cellule statisticamente rilevante. Infatti in ogni piastra sono state piastrate circa 25.000 cellule, mentre in ogni inquadratura sono state osservate circa 300 cellule. L'esperimento è stato ripetuto tre volte.

L'istogramma raffigurato in fig. 11A mostra i risultati dell'esperimento di controllo effettuato con mezzo completo. Come si può osservare non c'è alcuna variazione di rilievo nel numero di cellule differenziate in ogni tipo cellulare, ciò indica che né l'over-espressione della PN1 né la presenza di trombina alterano la morfologia cellulare.

L'istogramma raffigurato in fig. 11B mostra i risultati dell'induzione al differenziamento mediante aggiunta al mezzo di crescita di NGF. Nelle cellule PC12 non c'è nessuna influenza sul differenziamento da parte della doxiciclina, mentre la presenza di trombina perturba il differenziamento, riducendo di circa il 50% il numero di cellule differenziate. L'effetto negativo della trombina su



**Fig. 11** Istogrammi degli esperimenti condotti su cellule PC12, clone 28 e clone 3 durante il differenziamento. A) Esperimento di controllo condotto su cellule coltivate in mezzo completo. B) Esperimento condotto su cellule differenziate mediante aggiunta di NGF. C) Esperimento condotto su cellule differenziate mediante deprivazione di siero.

cellule nervose differenziate è stato già osservato in precedenza su altre linee cellulari (Turgeon et al., 1998; Jalink et al., 1994) ed è confermato nelle PC12 da questi esperimenti. Anche nel caso dei cloni non c'è variazione nel numero di cellule differenziate in presenza o assenza di doxiciclina, ciò significa che non c'è influenza diretta della over-espressione di PN1 sul differenziamento indotto da NGF (fig.11B, campioni 28+D+NGF, 28-D+NGF, 3+D+NGF, 3-D+NGF). Osservando i valori degli stessi campioni al cui mezzo è stata aggiunta trombina 10nM (fig.11B, campioni 28+D+NGF+thr, 28-D+NGF+thr, 3+D+NGF+thr, 3-D+NGF+thr) si può notare che in presenza di doxiciclina si ha una diminuzione del numero di cellule differenziate, come accade nelle cellule PC12. In assenza di doxiciclina, ossia in caso di over-espressione di PN1, il numero di cellule differenziate è molto vicino a quello dei campioni a cui non è stata aggiunta trombina al mezzo. L'aumento dell'espressione di PN1 porta alla protezione delle cellule differenziate dagli effetti dell'esposizione alla trombina.

L'istogramma raffigurato in fig. 11C è relativo ai dati ottenuti dall'esperimento di differenziamento mediante deprivazione di siero. Come si può vedere nelle cellule PC12 la presenza di trombina 10nM non influenza il differenziamento (fig. 11C, campioni PC12+D0.8%+thr, PC12-D0.8%+thr). Un'ipotesi per questi risultati è che il differenziamento potrebbe essere dovuto all'attivazione di un pathway diverso da quello innescato dal NGF. La proteina responsabile del differenziamento potrebbe essere normalmente prodotta dalle PC12 ma inibita da proteine presenti nel siero. Per i campioni di cellule di cloni si vede che in caso di over-espressione di PN1 (fig.11C, campioni 28-D0.8% e 3-D0.8%) il numero di cellule differenziate diminuisce. Tale fenomeno è revertito dalla presenza di trombina. La PN1 potrebbe avere una certa affinità con la proteina responsabile del differenziamento; è per questo che in caso di over-espressione riesce ad inibirla. A conferma di ciò c'è l'evidenza che la trombina, per la quale la PN1 ha un'affinità maggiore, essendo il suo inibitore fisiologico, riesce a ripristinare il differenziamento.

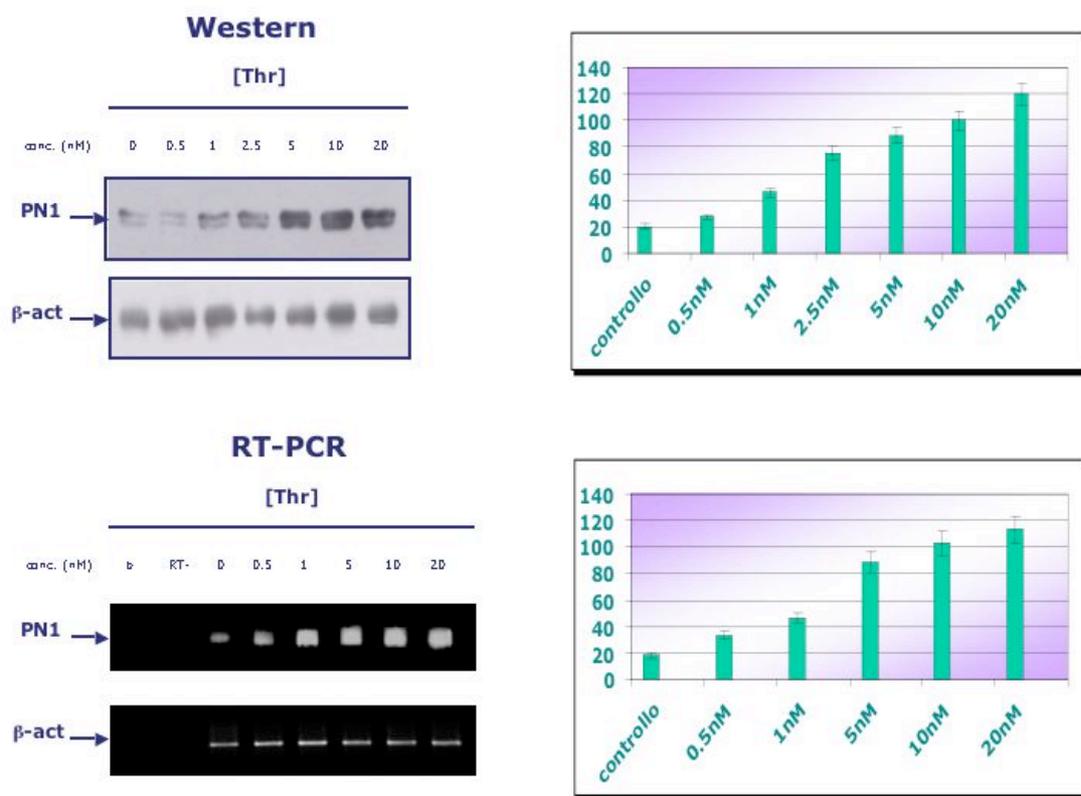
### 5.1.3 Induzione dell'espressione di PN1 dipendente dalla trombina

Dai campioni utilizzati per l'analisi del differenziamento sono stati prelevati i lisati totali questi sono stati analizzati mediante *western blot*, per controllare l'effettiva induzione del sistema *tet-off* nelle condizioni sperimentali utilizzate per il differenziamento. Da tale analisi è risultata una buona efficienza dell'induzione dell'espressione di PN1 dovuta al sistema *tet-off*. Inoltre è stata notata un'induzione dell'espressione di PN1 nel caso di presenza di trombina. Tale aumento è indipendente dal sistema *tet-off* dato che è stato osservato anche nelle cellule PC12 *wild type*.

Per verificare che l'induzione dell'espressione di PN1 è direttamente correlata alla presenza di trombina, sono stati effettuati esperimenti in presenza di concentrazioni crescenti di trombina e esperimenti di *time course* in presenza di trombina 10nM su cellule PC12 *wild type*. In fig. 12 e 13 sono mostrati esperimenti di *western blot* su 30 $\mu$ g di lisati totali e di RT-PCR semiquantitativa su RNA totale delle cellule PC12 trattate con la trombina.

Nel caso degli esperimenti con gradiente di concentrazione (fig.12) sono state utilizzate concentrazioni che vanno da 0.5 a 20nM di trombina, le cellule sono state raccolte a 48 ore dal trattamento e l'esperimento è stato ripetuto 3 volte. A destra della figura sono rappresentati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni dei *western blot* e delle RT-PCR utilizzando il programma *NIHImage*. Sull'asse delle ascisse sono riportati i valori di concentrazione di trombina con cui sono stati trattati i campioni, sull'asse delle ordinate sono riportati i valori arbitrari delle quantizzazioni opportunamente normalizzati ed espressi in percentuale. Dagli istogrammi, mostrati sulla destra della fig. 12, si vede che l'aumento della proteina e dell'mRNA per PN1 sono lineari con l'aumentare della concentrazione di trombina.

Per gli esperimenti di *time course* (fig. 13) è stata scelta la concentrazione 10nM di trombina, a questa concentrazione l'aumento



*Fig. 12* Analisi dell'induzione dell'espressione proteica (western blot) e di mRNA (RT-PCR) per PN1 dopo trattamento con concentrazioni crescenti di trombina. Sulla destra della figura sono mostrati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni rispettivamente dei western e delle RT-PCR.

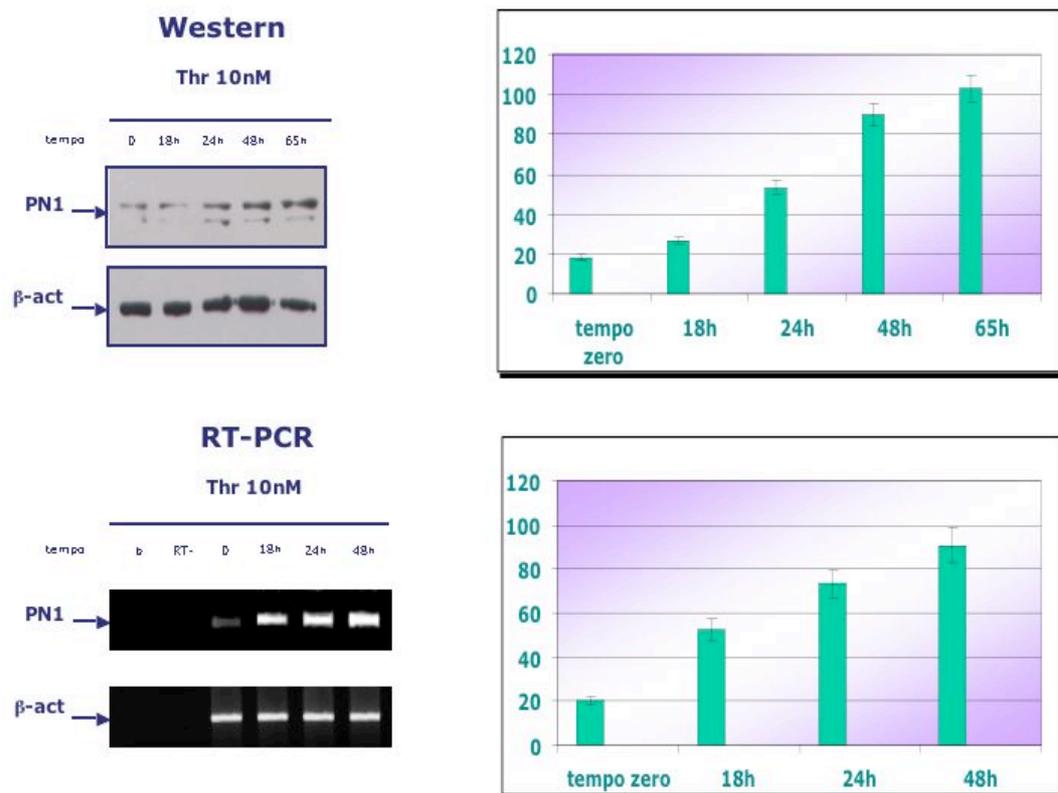
di espressione di PN1 è in fase esponenziale. I campioni di lisati sono stati prelevati a 18, 24, 48 e 65 ore dall'aggiunta di trombina, come controllo sono stati usati i lisati delle PC12 non trattate. I campioni di RNA sono stati estratti a 18, 24 e 48 ore dall'aggiunta di trombina, come controllo è stato usato RNA totale estratto da cellule PC12 non trattate. L'esperimento è stato ripetuto tre volte. A destra della figura sono rappresentati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni dei *western blot* e delle RT-PCR utilizzando il programma *NIHImage*. Sull'asse delle ascisse sono riportati i tempi a cui sono stati prelevati i campioni trattati con trombina 10nM, sull'asse delle ordinate sono riportati i valori arbitrari delle quantizzazioni opportunamente normalizzati ed espressi in percentuale. Come risulta dagli istogrammi dei *western blot* e delle RT-PCR anche in questo caso l'aumento della PN1 è linearmente dipendente dal tempo.

Gli esperimenti sulle PC12 in presenza di trombina evidenziano chiaramente come questa proteasi sia in grado di indurre la PN1, la linearità dell'aumento inoltre dimostra un coinvolgimento diretto della trombina.

## 5.2 Silenziamento della PN1

### 5.2.1 Costrutti per RNA interference

Come già descritto nel paragrafo 3.2.2 per permettere l'attivazione del meccanismo di RNA *interference* in cellule eucariotiche c'è bisogno di introdurre piccole molecole di RNA a doppio filamento di 19-22 nucleotidi. In particolare per permettere una soppressione stabile del gene di interesse è utile transfettare le cellule con costrutti plasmidici che contengono le sequenze per gli shRNA e una resistenza ad un antibiotico. Per l'espressione dei piccoli RNA è necessario che il plasmide contenga un promotore per polimerasi III che è in grado di guidare appunto la trascrizione di



*Fig. 13* Analisi dell'induzione dell'espressione proteica (western blot) e di mRNA (RT-PCR) per PN1 dopo trattamento con trombina 10nM a vari tempi. Sulla destra della figura sono mostrati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni rispettivamente dei western e delle RT-PCR.

piccoli RNA. Il plasmide utilizzato è pAVU6+27 che contiene la cassetta per il promotore U6 per gli *small nuclear RNA* e il gene per la resistenza alla neomicina. La cassetta che contiene U6 è costruita in modo che la sequenza che codifica per lo shRNA sia inserita nei siti unici di restrizione Sall e XbaI. La sequenza codificante per gli shRNA è costituita dalla sequenza "senso" di 19 nucleotidi, una sequenza per il *loop* di 9 nucleotidi, la sequenza antisenso di 19 nucleotidi e un terminatore costituito da una sequenza di cinque timidine. La sequenza "senso" è costituita da una sequenza omologa al cDNA di PN1, la scelta di tale sequenza è stata effettuata tenendo conto dei fattori che influenzano l'efficienza del silenziamento. In particolare sono stati utilizzati l'algoritmo disponibile sul sito [www.genescrypt.com](http://www.genescrypt.com) e l'algoritmo disponibile sul sito [www.ambion.com](http://www.ambion.com). I criteri che sono alla base di entrambi gli algoritmi per la scelta dello shRNA sono i seguenti:

1. lunghezza del sito bersaglio (19nt),
2. contenuto in GC compreso tra 35% e 60%,
3. la sequenza bersaglio deve essere il più vicino possibile all'ATG del cDNA del gene target,
4. le sequenze non uniche per il genoma analizzato (in questo caso ratto) vengono scartate,
5. le sequenze "senso" e antisenso non devono poter formare strutture secondarie,
6. le sequenze con *tandem repeats* vengono scartate,
7. le sequenze che sono omologhe a regioni che contengono SNP sono scartate,
8. ogni sequenza target viene comparata con il *database* di EST/mRNA per l'organismo di interesse e le sequenze che si sovrappongono per più di 17bp con altri trascritti sono scartate.

Delle sequenze ottenute tenendo presenti questi criteri ne sono state scelte quattro, che sono risultate le più vicine all'ATG del cDNA di PN1. Inoltre è stato controllato che le regioni bersaglio dell'mRNA di PN1 non fossero comprese in zone dell'mRNA con struttura secondaria

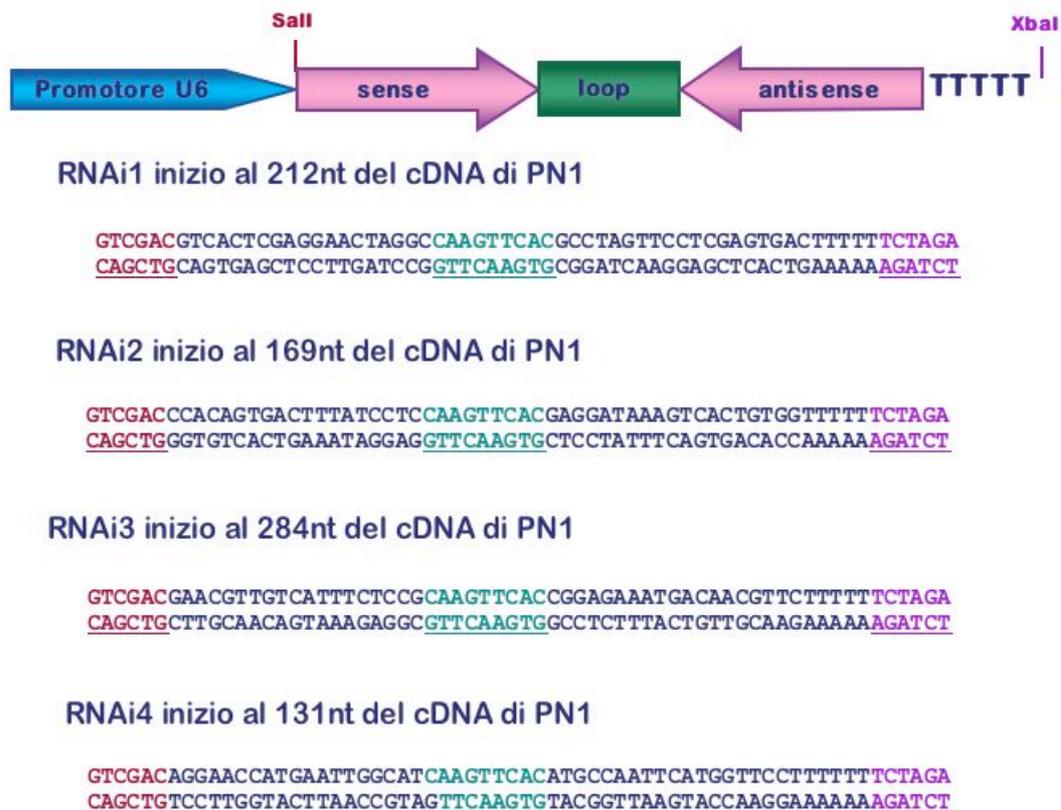
complessa, utilizzando il programma *M-fold* che predice le strutture secondarie di sequenze di mRNA.

Nella costruzione dello shRNA è importante la scelta del *loop*, che è essenziale per l'esporto dello shRNA al citoplasma (Cullen, 2003), distretto nel quale avviene il processo dell'*RNA interference*. Il loop scelto ha una lunghezza di 9nt e ha due sequenze CA, trascritte in GU nello shRNA corrispondente, tali sequenze potrebbero favorire il legame con proteine che esportano RNA dal nucleo al citoplasma (Neuman et al., 2003 e Perez Canadillas and Varani, 2003). In fig. 14 sono mostrati il costrutto utilizzato e le sequenze dei quattro shRNA.

Le sequenze degli shRNA sono state sintetizzate nei laboratori del CEINGE Biotecnologie Avanzate e sono state clonate nel plasmide pAVU6+27 opportunamente linearizzato con le endonucleasi di restrizione Sall e XbaI. I plasmidi ottenuti (pRNAi1, pRNAi2, pRNAi3, pRNAi4, pRNAi/random, quest'ultimo contiene uno shRNA che non ha specificità per alcun mRNA) sono stati sequenziati per controllare la corretta inserzione del piccolo frammento. L'analisi della sequenza ha mostrato una perfetta omologia degli shRNA clonati con quelli descritti nella fig.14.

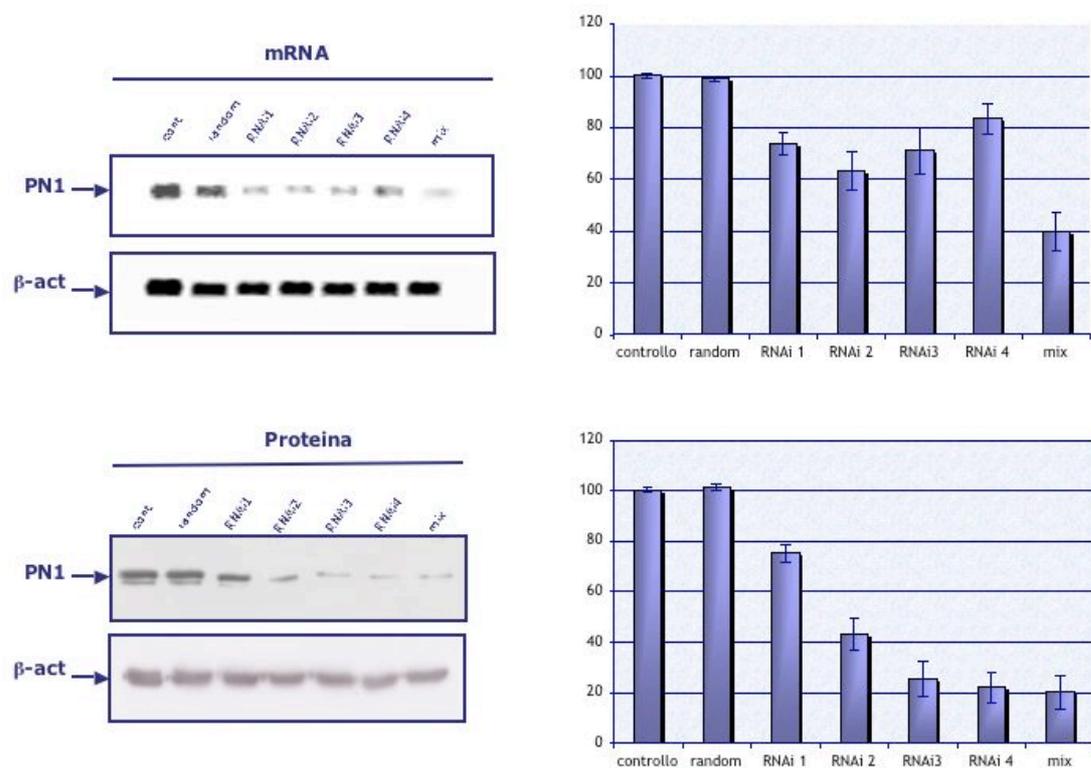
### 5.2.2 Transfezione in cellule C6

Le cellule C6 sono state transfettate mediante il metodo della lipofezione (lipofectamina 2000, Invitrogen) con i vari costrutti contenenti gli shRNA; oltre alla transfezione con i singoli costrutti è stata effettuata una transfezione di una mix di DNA che conteneva i quattro pRNAi in pari concentrazioni. Quest'ultima transfezione è stata effettuata perché sembrerebbe che la presenza di più shRNA diretti contro varie regioni del mRNA bersaglio aumenti l'efficienza del *RNA interference*. A 48 ore dalla transfezione le cellule sono state raccolte e sono stati preparati lisati ed RNA totale. I lisati totali sono stati analizzati mediante *western blot*. Come anticorpi primari sono



*Fig.14* Nella figura è raffigurato il costrutto utilizzato per lo spegnimento della PN1 mediante RNA interference e le sequenze dei quattro sh utilizzati. Per ogni sequenza di sh RNA è riportata la regione dell'inizio dell'appaiamento con il cDNA di PN1.

stati utilizzati siero di coniglio anti PN1 (*home made*), per controllare la riduzione di espressione della proteina, e immunoglobuline di topo anti  $\beta$ -actina (Sigma), per normalizzare i risultati. L'RNA totale è stato analizzato mediante *northern blot* utilizzando una sonda specifica per PN1, per valutare lo spegnimento genico, e una sonda specifica per  $\beta$ -actina per normalizzare il risultato. Nella fig. 15 sono mostrati i risultati di tre esperimenti indipendenti di *northern blot* e *western blot* rispettivamente su RNA totale e lisati totali di cellule transfettate. A destra della figura sono rappresentati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni degli esperimenti effettuati. Sull'asse delle ascisse sono riportati i campioni analizzati. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori delle quantizzazioni, effettuati con il programma *Quantity One*, opportunamente normalizzati rispetto al controllo ed espressi in percentuale. Come si può vedere dagli istogrammi la riduzione di espressione dell'mRNA è poco efficiente. La maggiore diminuzione dell'mRNA (60%) per PN1 si ha nel caso in cui si utilizza la mix; ovvero quando si transfettano contemporaneamente i quattro costrutti di shRNA. Tale risultato era atteso, infatti come già descritto in questo paragrafo l'uso di più molecole di shRNA è più efficiente nel guidare la degradazione dell'mRNA bersaglio. Guardando invece l'istogramma relativo alle quantizzazioni dei *western blot*, si nota che in tre campioni (RNAi3, RNAi4 e mix) si ha un'efficiente riduzione dell'espressione proteica, che risulta ridotta del 80%. Tale risultato può essere interpretato come un buon spegnimento della proteina anche perché le transfezioni effettuate non hanno previsto l'isolamento di cloni che esprimono stabilmente lo shRNA. Infatti nelle cellule C6 l'efficienza di transfezione mediante lipofectamina è circa del 70%, quindi nella popolazione di cellule analizzate c'è una relativa abbondanza di cellule in cui il meccanismo del RNA *interference* non può essere attivato.



*Fig.15* Analisi dello spegnimento dell'espressione di RNA (mediante northern blot) e di proteina (mediante western blot) per PN1 dopo transfezione transiente con i costrutti per l'RNA interference. Sulla destra della figura sono mostrati gli istogrammi relativi alle quantizzazioni rispettivamente dei northern blot e dei western blot.



Capitolo 6

# Conclusioni

Il coinvolgimento della PN1 nel differenziamento e organogenesi del sistema nervoso centrale (Mansuy et al., 1993; Drapkin et al., 2002), nonché la sua preponderante presenza in questo distretto (Reinhard et al., 1994, Niclou et al., 1998), ci hanno indotto ad indagare sulle funzioni fisiologiche di questa serpina. In particolare la nostra intenzione è stata quella di chiarire il suo ruolo in sistemi cellulari neurali e gliali quali le PC12 e le C6. Nelle prime la produzione di PN1 è relativamente bassa rispetto alle C6. La PN1 è capace di favorire il differenziamento cellulare in alcune linee cellulari, quali le Nb2A (Monrad, 1988, Shea, 1995). Per questi motivi ci è sembrato utile mettere a punto un sistema inducibile per l'over-espressione di PN1 nelle cellule PC12, che sono in grado di differenziarsi in neuriti tramite aggiunta di NGF o tramite deprivazione di siero (Greene and Tischler, 1976; Dichter et al., 1977; Tischler and Greene, 1978). Date queste premesse è stato possibile monitorare l'effetto di una over-espressione di PN1 durante il processo di differenziamento. Dagli esperimenti di differenziamento è risultato chiaro che l'over-espressione della PN1 da sola non produce alcun effetto di rilievo in cellule PC12 in condizioni normali di crescita o anche durante il differenziamento mediato da NGF. Ma nel caso della presenza di trombina in cellule PC12, indotte al differenziamento con l'aggiunta di NGF, si è visto che la PN1 è in grado di proteggere le cellule differenziate dall'azione di questa proteasi. Questa è una conferma dell'ipotesi che la PN1 prodotta nel sistema nervoso centrale possa avere un ruolo di protezione in caso di stravasi (Shea, 1995). Considerando poi l'esperimento di differenziamento mediante deprivazione di siero si è potuto constatare che potrebbe essere presente un altro mediatore del differenziamento e che in qualche modo la PN1 sia in grado di inibirlo. Questo fa supporre che si tratti di una proteasi a serina per la quale la PN1 ha una certa affinità. Future analisi per identificare questo mediatore saranno utili a identificare altri fattori coinvolti nel differenziamento neuronale e chiarire se la PN1 possa avere un ruolo

nell'inibizione di essi. Sarà interessante soprattutto verificare la possibilità che la PN1 possa essere un regolatore del differenziamento neuronale intervenendo a suo favore in determinate situazioni e a suo sfavore in altre.

Gli esperimenti di differenziamento sono stati utili anche per identificare l'induzione di espressione della PN1 in presenza di trombina. I valori di aumento dell'espressione proteica sono inferiori rispetto a quelli dovuti all'induzione del sistema *tet-off* e non influenzano il differenziamento cellulare, almeno dal punto di vista morfologico. La concentrazione di trombina utilizzata (10nM) è comunque inferiore a quella fisiologica in caso di stravasi (Coughlin, 1999). L'induzione di PN1 è interessante soprattutto alla luce di esperimenti pubblicati in un recente lavoro (Richard et al., 2004). Esso analizza la *down-regulation* della PN1 in cellule RASMC (*Rat Aortic Smooth Muscle Cells*), è stato dimostrato che tale *down-regulation* dipende dalla trombina, in particolare è l'attivazione di PAR1 (recettore della trombina) che ha come effetto la diminuzione dell'espressione di PN1. In cellule della muscolatura liscia, quali le RASMC, la trombina è in grado di attivare la proliferazione cellulare (Cucina et al., 1999). Si può notare che in cellule neurali l'effetto dell'induzione è congruo con il ruolo della PN1 nel sistema nervoso centrale. Infatti in caso di stravasi l'effetto della trombina sulle cellule nervose sarebbe quello di provocare un dedifferenziamento (Turgeon and Houenou, 1997; Turgeon et al., 1998), un'aumentata produzione di PN1 potrebbe proteggere totalmente le cellule nervose da questo effetto, come visto dagli esperimenti di differenziamento. Le cellule della muscolatura liscia vengono a contatto con la trombina attiva in caso di rottura del vaso; è quindi importante che la trombina svolga il suo ruolo di attivatore della proliferazione in questo distretto, in modo da ripristinare velocemente la struttura del vaso sanguigno. Ciò significa che la presenza di PN1 in questo caso potrebbe avere effetti negativi in questo processo e potrebbe essere per questo motivo che la sua produzione venga diminuita. Di sicuro

alla base dei fenomeni di *down-regulation* per le RASMC e di induzione per le PC12 devono esserci mediatori differenti. Sarà interessante analizzare quali possano essere i mediatori della regolazione di PN1 in presenza di trombina. Un primo passo potrebbe essere quello di utilizzare il peptide TRAP che mima il prodotto del taglio della trombina al proprio recettore PAR1 attivandolo (Stiernberg, 1993). Gli esperimenti con l'utilizzo di TRAP saranno utili a valutare se l'induzione di PN1 dipenda dall'attivazione di PAR1 oppure se piuttosto possa essere una deplezione di PN1 nella matrice extracellulare a provocare l'induzione di questa serpina nelle cellule PC12.

L'altra parte del lavoro ha riguardato lo spegnimento genico di PN1 mediante RNA *interference* in cellule C6. Queste ultime come già accennato sono cellule gliali e producono grandi quantità di PN1. Le cellule di sostegno dei neuroni infatti sono tra quelle cellule che producono la maggiore quantità di questa serpina (Monard, 1988). Inoltre le C6 sono in grado di differenziarsi in astrociti (Parker et al., 1980), sarebbe dunque interessante analizzare il differenziamento di queste cellule in caso di spegnimento genico della PN1. Nel presente lavoro è descritta la messa appunto del sistema per lo spegnimento mediante RNA *interference*. Nella prima fase della messa a punto del sistema sono state scelte le sequenze che potessero essere il miglior target per l'attivazione del meccanismo di *interference*. I criteri utilizzati sono quelli descritti nel paragrafo 5.1.1, tali criteri si basano sull'osservazione oggettiva che la sequenza deve essere specifica per l'mRNA del gene di interesse, che il sito per la complementarità deve essere facilmente accessibile (Kretschmer-Kazemi Far and Sczakiel, 2003), che la molecola di shRNA prodotta dalla trascrizione deve essere stabile. La scelta poi delle sequenze più vicine all'ATG di inizio della trascrizione è dovuta al fatto che è stato notato che quanto più vicino all'ATG è la sequenza bersaglio tanto più è efficiente il processo di RNA *interference* (Bartel, 2004). Questo fenomeno è dovuto al fatto che il complesso RISC che si lega al mRNA

target impedisce il legame del ribosoma per l'inizio della traduzione. Dai dati riportati in letteratura si evince che shRNA diretti contro diverse zone del mRNA bersaglio hanno diverse efficienze nell'attivare il processo dell'RNA *interference* (Dykxhoorn et al., 2003). Per questo motivo sono stati utilizzati quattro diversi costrutti. Inoltre è stato notato che l'utilizzo contemporaneo di più sequenze di shRNA dirette contro lo stesso mRNA bersaglio aumentano l'efficienza del silenziamento (Baulcombe, 2005): è per questo motivo che abbiamo utilizzato per la transfezione anche una mix con i quattro costrutti presenti in uguale concentrazione. Dagli esperimenti su campioni prelevati da cellule transfettate in transiente risulta evidente che per i campioni RNAi3, RNAi4 e mix si ha un'efficiente riduzione di espressione proteica mentre si ha una minore riduzione di mRNA per PN1. Questa differenza di efficienza potrebbe dipendere dalla linea cellulare utilizzata o dalla stabilità del mRNA bersaglio ed è già descritta in letteratura (Dykxhoorn et al., 2003). Tale fenomeno è dovuto al fatto che il complesso RISC si complementa con il mRNA bersaglio impedendo la traduzione ma potrebbe non essere in grado di guidare efficientemente il processo di degradazione del mRNA. L'inefficienza del RISC nel tagliare l'mRNA è descritta in letteratura (Tang, 2005) e può dipendere da tre fattori. Il primo è che esistono due tipi di RISC: il RISC in grado di tagliare l'mRNA e quello che riesce solo ad attuare il blocco della traduzione. Quest'ultimo potrebbe essere più abbondante nelle cellule C6. Il secondo fattore riguarda le condizioni di appaiamento tra lo siRNA e l'mRNA, il RISC non taglia l'mRNA bersaglio se la zona dell'appaiamento è poco accessibile o se l'appaiamento non è adeguatamente lungo. Solo un esteso appaiamento in regioni particolari provoca il taglio dell'mRNA bersaglio, altrimenti si ha solo il blocco della traduzione. Il terzo e ultimo fattore è relativo all'osservazione che potrebbe esserci una regolazione dell'attività nucleasica del RISC in grado di determinare se l'mRNA bersaglio debba essere tagliato o meno (Chen, 2004). Tale regolazione potrebbe essere attuata proprio nelle C6; infatti gli

esperimenti effettuati mostrano un tasso di degradazione dell'mRNA che non supera la soglia del 60%, mentre si ha un'efficiente blocco della traduzione. Gli esperimenti di transfezione in transiente sono preliminari per verificare l'efficienza dei costrutti utilizzati nell'attivare il processo di RNA *interference*. L'isolamento di cloni stabili, per i costrutti che mostrano un efficiente silenziamento, sarà necessario per analizzare l'effetto della mancanza di PN1 in queste cellule in caso di differenziamento cellulare.



# Bibliografia

1. Almeida, R. and Allshire, R.C. (2005) RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol*, **15**, 251-258.
2. Aymerich, M.S., Alberdi, E.M., Martinez, A. and Becerra, S.P. (2001) Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**, 3287-3293.
3. Baker, J.B. and Gronke, R.S. (1986) Protease nexins and cellular regulation. *Semin Thromb Hemost*, **12**, 216-220.
4. Banda, M.J., Rice, A.G., Griffin, G.L. and Senior, R.M. (1988) The inhibitory complex of human alpha 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J Exp Med*, **167**, 1608-1615.
5. Bar-Shavit, R., Kahn, A., Mudd, M.S., Wilner, G.D., Mann, K.G. and Fenton, J.W., 2nd. (1984) Localization of a chemotactic domain in human thrombin. *Biochemistry*, **23**, 397-400.
6. Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
7. Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
8. Baulcombe, D. (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci*, **30**, 290-293.
9. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**, 370-371.
10. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
11. Biales, B., Dichter, M. and Tischler, A. (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, **262**, 743-753.
12. Blasi, F., Ciarrocchi, A., Luddi, A., Strazza, M., Riccio, M., Santi, S., Arcone, R., Pietropaolo, C., D'Angelo, R., Costantino-Ceccarini, E. *et al.* (2002) Stage-specific gene expression in early differentiating oligodendrocytes. *Glia*, **39**, 114-123.
13. Bode, W. and Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem*, **204**, 433-451.
14. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
15. Buchholz, M., Biebl, A., Neebete, A., Wagner, M., Iwamura, T., Leder, G., Adler, G. and Gress, T.M. (2003) SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. *Cancer Res*, **63**, 4945-4951.
16. Carrell RW, P.P., Boswell DR. (1987) The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors.*, **52**, 527-535.
17. Chen, X. (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, **303**,

- 2022-2025.
18. Clark M, J.S., Leharach H, Lee R, Li F, Marra M, Eddy S, Hillier L, Kucaba T, Martin J, Beck C, Wylie T, Underwood K, Stepoe M, Theising B, Allen M, Bowers Y, Person B, Swaller T, Gibbons M, Pape D, Harvey N, Schurk R, Ritter E, Kohn S, Shin T, Jackson Y, Cardenas M, McCann R, Waterson R and Wilson R (1998) *Genbank*, entry **9821294**.
  19. Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U. and Macino, G. (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J*, **15**, 3153-3163.
  20. Coughlin, S.R. (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11023-11027.
  21. Cox, D.W. and Billingsley, G.D. (1989) Rare deficiency types of alpha 1-antitrypsin: electrophoretic variation and DNA haplotypes. *Am J Hum Genet*, **44**, 844-854.
  22. Crisp, R.J., Knauer, D.J. and Knauer, M.F. (2000) Roles of the heparin and low density lipid receptor-related protein-binding sites of protease nexin 1 (PN1) in urokinase-PN1 complex catabolism. The PN1 heparin-binding site mediates complex retention and degradation but not cell surface binding or internalization. *J Biol Chem*, **275**, 19628-19637.
  23. Cucina, A., Borrelli, V., Di Carlo, A., Pagliei, S., Corvino, V., Santoro-D'Angelo, L., Cavallaro, A. and Sterpetti, A.V. (1999) Thrombin induces production of growth factors from aortic smooth muscle cells. *J Surg Res*, **82**, 61-66.
  24. Cullen, B.R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, **28**, 419-424.
  25. Cunningham, D.D. (1992) Regulation of neuronal cells and astrocytes by protease nexin-1 and thrombin. *Ann N Y Acad Sci*, **674**, 228-236.
  26. Cunningham, D.D. and Gurwitz, D. (1989) Proteolytic regulation of neurite outgrowth from neuroblastoma cells by thrombin and protease nexin-1. *J Cell Biochem*, **39**, 55-64.
  27. Cunningham, D.D., Pulliam, L. and Vaughan, P.J. (1993) Protease nexin-1 and thrombin: injury-related processes in the brain. *Thromb Haemost*, **70**, 168-171.
  28. Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lacbawan, F. *et al.* (1999) Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature*, **401**, 376-379.
  29. Dawson, D.W., Volpert, O.V., Gillis, P., Crawford, S.E., Xu, H., Benedict, W. and Bouck, N.P. (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, **285**, 245-248.
  30. Debeir, T., Benavides, J. and Vige, X. (1998) Involvement of protease-activated receptor-1 in the in vitro development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience*, **82**, 739-752.
  31. Detwiler, T.C., Chang, A.C., Speziale, M.V., Browne, P.C.,

- Miller, J.J. and Chen, K. (1992) Complexes of thrombin with proteins secreted by activated platelets. *Semin Thromb Hemost*, **18**, 60-66.
32. Dichter, M.A., Tischler, A.S. and Greene, L.A. (1977) Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature*, **268**, 501-504.
33. Donovan, F.M., Vaughan, P.J. and Cunningham, D.D. (1994) Regulation of protease nexin-1 target protease specificity by collagen type IV. *J Biol Chem*, **269**, 17199-17205.
34. Drapkin, P.T., Monard, D. and Silverman, A.J. (2002) The role of serine proteases and serine protease inhibitors in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *BMC Dev Biol*, **2**, 1.
35. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 457-467.
36. Eaton, D.L. and Baker, J.B. (1983) Evidence that a variety of cultured cells secrete protease nexin and produce a distinct cytoplasmic serine protease-binding factor. *J Cell Physiol*, **117**, 175-182.
37. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
38. Elliott, P.R., Abrahams, J.P. and Lomas, D.A. (1998) Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation. *J Mol Biol*, **275**, 419-425.
39. Evans, D.L., McGrogan, M., Scott, R.W. and Carrell, R.W. (1991) Protease specificity and heparin binding and activation of recombinant protease nexin I. *J Biol Chem*, **266**, 22307-22312.
40. Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11650-11654.
41. Fenton, J.W., 2nd. (1988) Regulation of thrombin generation and functions. *Semin Thromb Hemost*, **14**, 234-240.
42. Festoff, B.W., Rao, J.S. and Hantai, D. (1991) Plasminogen activators and inhibitors in the neuromuscular system: III. The serpin protease nexin I is synthesized by muscle and localized at neuromuscular synapses. *J Cell Physiol*, **147**, 76-86.
43. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
44. Gettins, P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*, **102**, 4751-4804.
45. Gil, J. and Esteban, M. (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, **5**, 107-114.

46. Gingrich, M.B. and Traynelis, S.F. (2000) Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci*, **23**, 399-407.
47. Gloor, S., Odink, K., Guenther, J., Nick, H. and Monard, D. (1986) A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell*, **47**, 687-693.
48. Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.
49. Grabham, P. and Cunningham, D.D. (1995) Thrombin receptor activation stimulates astrocyte proliferation and reversal of stellation by distinct pathways: involvement of tyrosine phosphorylation. *J Neurochem*, **64**, 583-591.
50. Greene, L.A. and Rein, G. (1977) Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheo-chromocytoma cells. *Brain Res*, **129**, 247-263.
51. Greene, L.A. and Rukenstein, A. (1981) Regulation of acetylcholinesterase activity by nerve growth factor. Role of transcription and dissociation from effects on proliferation and neurite outgrowth. *J Biol Chem*, **256**, 6363-6367.
52. Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2424-2428.
53. Grimmond, S., Van Hateren, N., Siggers, P., Arkell, R., Larder, R., Soares, M.B., de Fatima Bonaldo, M., Smith, L., Tymowska-Lalanne, Z., Wells, C. *et al.* (2000) Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum Mol Genet*, **9**, 1553-1560.
54. Gurwitz, D. and Cunningham, D.D. (1990) Neurite outgrowth activity of protease nexin-1 on neuroblastoma cells requires thrombin inhibition. *J Cell Physiol*, **142**, 155-162.
55. Hagglund, A.C., Ny, A., Liu, K. and Ny, T. (1996) Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation. *Endocrinology*, **137**, 5671-5677.
56. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
57. Hillen, W., Unger, B. and Klock, G. (1982) Analysis of tet operator-TET repressor complexes by thermal denaturation studies. *Nucleic Acids Res*, **10**, 6085-6097.
58. Hopkins, P.C. and Whisstock, J. (1994) Function of maspin. *Science*, **265**, 1893-1894.
59. Huntington, J.A. (2003) Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis. *J Thromb Haemost*, **1**, 1535-1549.
60. Huntington, J.A., Read, R.J. and Carrell, R.W. (2000) Structure

- of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **407**, 923-926.
61. Irving, J.A., Pike, R.N., Lesk, A.M. and Whisstock, J.C. (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res*, **10**, 1845-1864.
  62. Irving, J.A., Steenbakkers, P.J., Lesk, A.M., Op den Camp, H.J., Pike, R.N. and Whisstock, J.C. (2002) Serpins in prokaryotes. *Mol Biol Evol*, **19**, 1881-1890.
  63. Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*, **126**, 801-810.
  64. Janciauskiene, S. (2001) Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta*, **1535**, 221-235.
  65. Jesty, J. (1979) Dissociation of complexes and their derivatives formed during inhibition of bovine thrombin and activated factor X by antithrombin III. *J Biol Chem*, **254**, 1044-1049.
  66. Ketting, R.F. and Plasterk, R.H. (2000) A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, **404**, 296-298.
  67. Kim, S., Buonanno, A. and Nelson, P.G. (1998) Regulation of prothrombin, thrombin receptor, and protease nexin-1 expression during development and after denervation in muscle. *J Neurosci Res*, **53**, 304-311.
  68. Knauer, D.J., Majumdar, D., Fong, P.C. and Knauer, M.F. (2000) SERPIN regulation of factor XIa. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor. *J Biol Chem*, **275**, 37340-37346.
  69. Knauer, M.F., Hawley, S.B. and Knauer, D.J. (1997) Identification of a binding site in protease nexin I (PN1) required for the receptor mediated internalization of PN1-thrombin complexes. *J Biol Chem*, **272**, 12261-12264.
  70. Knauer, M.F., Kridel, S.J., Hawley, S.B. and Knauer, D.J. (1997) The efficient catabolism of thrombin-protease nexin 1 complexes is a synergistic mechanism that requires both the LDL receptor-related protein and cell surface heparins. *J Biol Chem*, **272**, 29039-29045.
  71. Kretschmer-Kazemi Far, R. and Sczakiel, G. (2003) The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4417-4424.
  72. Kurdowska, A. and Travis, J. (1990) Acute phase protein stimulation by alpha 1-antichymotrypsin-cathepsin G complexes. Evidence for the involvement of interleukin-6. *J Biol Chem*, **265**, 21023-21026.
  73. Kury, P., Schaeren-Wiemers, N. and Monard, D. (1997) Protease

- nexin-1 is expressed at the mouse met-/mesencephalic junction and FGF signaling regulates its promoter activity in primary met-/mesencephalic cells. *Development*, **124**, 1251-1262.
74. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
  75. Ley, T.J., Anagnou, N.P., Pepe, G. and Nienhuis, A.W. (1982) RNA processing errors in patients with beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 4775-4779.
  76. Ligoxygakis, P., Roth, S. and Reichhart, J.M. (2003) A serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*, **13**, 2097-2102.
  77. Liu, Z., Zhou, X., Shapiro, S.D., Shipley, J.M., Twining, S.S., Diaz, L.A., Senior, R.M. and Werb, Z. (2000) The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell*, **102**, 647-655.
  78. Luthi, A., Van der Putten, H., Botteri, F.M., Mansuy, I.M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schroder, M. *et al.* (1997) Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, **17**, 4688-4699.
  79. Mangoura, D., Sakellaridis, N., Jones, J. and Vernadakis, A. (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res*, **14**, 941-947.
  80. Mansuy, I.M., van der Putten, H., Schmid, P., Meins, M., Botteri, F.M. and Monard, D. (1993) Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Development*, **119**, 1119-1134.
  81. Matzke, M.A. and Matzke, A.J. (1991) Differential inactivation and methylation of a transgene in plants by two suppressor loci containing homologous sequences. *Plant Mol Biol*, **16**, 821-830.
  82. Mbebi, C., Hantai, D., Jandrot-Perrus, M., Doyennette, M.A. and Verdiere-Sahuque, M. (1999) Protease nexin I expression is up-regulated in human skeletal muscle by injury-related factors. *J Cell Physiol*, **179**, 305-314.
  83. Meins, M., Piosik, P., Schaeren-Wiemers, N., Franzoni, S., Troncoso, E., Kiss, J.Z., Brosamle, C., Schwab, M.E., Molnar, Z. and Monard, D. (2001) Progressive neuronal and motor dysfunction in mice overexpressing the serine protease inhibitor protease nexin-1 in postmitotic neurons. *J Neurosci*, **21**, 8830-8841.
  84. Mendes de Aguiar, C.B., Garcez, R.C., Alvarez-Silva, M. and Trentin, A.G. (2002) Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int J Dev Neurosci*, **20**, 563-571.
  85. Molinari, F., Meskanaite, V., Munnich, A., Sonderegger, P. and Colleaux, L. (2003) Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system. *Hum Mol Genet*, **12 Spec No 2**, R195-200.

86. Moll, S., Schaeren-Wiemers, N., Wohlwend, A., Pastore, Y., Fulpius, T., Monard, D., Sappino, A.P., Schifferli, J.A., Vassalli, J.D. and Izui, S. (1996) Protease nexin 1 in the murine kidney: glomerular localization and up-regulation in glomerulopathies. *Kidney Int*, **50**, 1936-1945.
87. Monard, D. (1988) Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. *Trends Neurosci*, **11**, 541-544.
88. Murer, V., Spetz, J.F., Hengst, U., Altrogge, L.M., de Agostini, A. and Monard, D. (2001) Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3029-3033.
89. Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
90. Neumann, S., Petfalski, E., Brugger, B., Grosshans, H., Wieland, F., Tollervy, D. and Hurt, E. (2003) Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p. *EMBO Rep*, **4**, 1156-1162.
91. Niclou, S.P., Suidan, H.S., Pavlik, A., Vejsada, R. and Monard, D. (1998) Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development and after nerve lesion. *Eur J Neurosci*, **10**, 1590-1607.
92. Noda-Heiny, H., Fujii, S. and Sobel, B.E. (1993) Induction of vascular smooth muscle cell expression of plasminogen activator inhibitor-1 by thrombin. *Circ Res*, **72**, 36-43.
93. Ohlsson, K. and Laurell, C.B. (1976) The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from the circulation of man. *Clin Sci Mol Med*, **51**, 87-92.
94. Paddison, P.J., Caudy, A.A. and Hannon, G.J. (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1443-1448.
95. Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. and Vaucheret, H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J*, **16**, 4738-4745.
96. Parker, K.K., Norenberg, M.D. and Vernadakis, A. (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science*, **208**, 179-181.
97. Patston, P.A. (2000) Serpins and other serine protease inhibitors. *Immunol Today*, **21**, 354.
98. Perez Canadillas, J.M. and Varani, G. (2003) Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *Embo J*, **22**, 2821-2830.
99. Pires Neto, M.A., Braga-de-Souza, S. and Lent, R. (1999) Extracellular matrix molecules play diverse roles in the growth and guidance of central nervous system axons. *Braz J Med Biol Res*, **32**, 633-638.

100. Poulin, G., Nandakumar, R. and Ahringer, J. (2004) Genome-wide RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*: impact on cancer research. *Oncogene*, **23**, 8340-8345.
101. Ragg, H., Lokot, T., Kamp, P.B., Atchley, W.R. and Dress, A. (2001) Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses. *Mol Biol Evol*, **18**, 577-584.
102. Reinhard, E., Suidan, H.S., Pavlik, A. and Monard, D. (1994) Glia-derived nexin/protease nexin-1 is expressed by a subset of neurons in the rat brain. *J Neurosci Res*, **37**, 256-270.
103. Richard, B., Arocas, V., Guillin, M.C., Michel, J.B., Jandrot-Perrus, M. and Bouton, M.C. (2004) Protease nexin-1: a cellular serpin down-regulated by thrombin in rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, **201**, 138-145.
104. Rovelli, G., Stone, S.R., Guidolin, A., Sommer, J. and Monard, D. (1992) Characterization of the heparin-binding site of glia-derived nexin/protease nexin-1. *Biochemistry*, **31**, 3542-3549.
105. Rushlow, C. (2004) Dorsoventral patterning: a serpin pinned down at last. *Curr Biol*, **14**, R16-18.
106. Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1988) Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 93-126.
107. Sambrook, J. Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989) Molecular cloning a laboratory manual. Second edition, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
108. Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**, 157-162.
109. Schuster, M.G., Enriquez, P.M., Curran, P., Cooperman, B.S. and Rubin, H. (1992) Regulation of neutrophil superoxide by antichymotrypsin-chymotrypsin complexes. *J Biol Chem*, **267**, 5056-5059.
110. Scott, R.W., Bergman, B.L., Bajpai, A., Hersh, R.T., Rodriguez, H., Jones, B.N., Barreda, C., Watts, S. and Baker, J.B. (1985) Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem*, **260**, 7029-7034.
111. Seegers, W.H. (1986) Postclotting fates of thrombin. *Semin Thromb Hemost*, **12**, 181-183.
112. Shea, T.B. (1995) Role of glial-derived nexin in neuronal differentiation and in acute brain injury and potential involvement in exacerbation of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, **20**, 171-184.
113. Shikamoto, Y. and Morita, T. (1999) Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. *FEBS Lett*, **463**, 387-389.
114. Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W. *et al.* (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions,

- and a revised nomenclature. *J Biol Chem*, **276**, 33293-33296.
115. Smith-Swintosky, V.L., Zimmer, S., Fenton, J.W., 2nd and Mattson, M.P. (1995) Opposing actions of thrombin and protease nexin-1 on amyloid beta-peptide toxicity and on accumulation of peroxides and calcium in hippocampal neurons. *J Neurochem*, **65**, 1415-1418.
  116. Sommer, J., Gloor, S.M., Rovelli, G.F., Hofsteenge, J., Nick, H., Meier, R. and Monard, D. (1987) cDNA sequence coding for a rat glia-derived nexin and its homology to members of the serpin superfamily. *Biochemistry*, **26**, 6407-6410.
  117. Steele, F.R., Chader, G.J., Johnson, L.V. and Tombran-Tink, J. (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1526-1530.
  118. Stiernberg, J., Redin, W.R., Warner, W.S. and Carney, D.H. (1993) The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thromb Haemost*, **70**, 158-162.
  119. Stone, S.R., Brown-Luedi, M.L., Rovelli, G., Guidolin, A., McGlynn, E. and Monard, D. (1994) Localization of the heparin-binding site of glia-derived nexin/protease nexin-1 by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **33**, 7731-7735.
  120. Strehlow, D., Jelaska, A., Strehlow, K. and Korn, J.H. (1999) A potential role for protease nexin 1 overexpression in the pathogenesis of scleroderma. *J Clin Invest*, **103**, 1179-1190.
  121. Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C. and Shi, Y. (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5515-5520.
  122. Tang, G. (2005) siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*, **30**, 106-114.
  123. Tischler, A.S. and Greene, L.A. (1978) Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Lab Invest*, **39**, 77-89.
  124. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
  125. Triezenberg, S.J., Kingsbury, R.C. and McKnight, S.L. (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*, **2**, 718-729.
  126. Triezenberg, S.J., LaMarco, K.L. and McKnight, S.L. (1988) Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev*, **2**, 730-742.
  127. Turgeon, V.L. and Houenou, L.J. (1997) The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, **25**, 85-95.

128. Turgeon, V.L., Lloyd, E.D., Wang, S., Festoff, B.W. and Houenou, L.J. (1998) Thrombin perturbs neurite outgrowth and induces apoptotic cell death in enriched chick spinal motoneuron cultures through caspase activation. *J Neurosci*, **18**, 6882-6891.
129. Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, **14**, 857-867.
130. van der Krol, A.R., Mol, J.N. and Stuitje, A.R. (1988) Antisense genes in plants: an overview. *Gene*, **72**, 45-50.
131. van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K. and Kalsheker, N. (2003) Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 1536-1547.
132. Vernadakis, A., Kentroti, S., Brodie, C., Mangoura, D. and Sakellaridis, N. (1991) C-6 glioma cells of early passage have progenitor properties in culture. *Adv Exp Med Biol*, **296**, 181-195.
133. Vouret-Craviari, V., Van Obberghen-Schilling, E., Rasmussen, U.B., Pavirani, A., Lecocq, J.P. and Pouyssegur, J. (1992) Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol Biol Cell*, **3**, 95-102.
134. Wilmouth, R.C., Edman, K., Neutze, R., Wright, P.A., Clifton, I.J., Schneider, T.R., Schofield, C.J. and Hajdu, J. (2001) X-ray snapshots of serine protease catalysis reveal a tetrahedral intermediate. *Nat Struct Biol*, **8**, 689-694.
135. Wolfer, D.P., Lang, R., Cinelli, P., Madani, R. and Sonderegger, P. (2001) Multiple roles of neurotrypsin in tissue morphogenesis and nervous system development suggested by the mRNA expression pattern. *Mol Cell Neurosci*, **18**, 407-433.
136. Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3469-3478.
137. Ye, S., Cech, A.L., Belmares, R., Bergstrom, R.C., Tong, Y., Corey, D.R., Kanost, M.R. and Goldsmith, E.J. (2001) The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat Struct Biol*, **8**, 979-983.
138. Yoshida, S. and Shiosaka, S. (1999) Plasticity-related serine proteases in the brain (review). *Int J Mol Med*, **3**, 405-409.



# Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Prof.<sup>ssa</sup> Concetta Pietropaolo, che mi ha consentito di partecipare a questo progetto di ricerca, la Prof.<sup>ssa</sup> Rosaria Arcone, che ha guidato la mia iniziale formazione in questo laboratorio, la Prof.<sup>ssa</sup> Giulia Russo e le Dr.<sup>sse</sup> Monica Cuccurese e Annapina Russo per i loro consigli e le stimolanti discussioni scientifiche.

Un particolare e doveroso ringraziamento va a Maurizio Lamagna e Maria Rosaria Arena Rocco per la loro pazienza e l'efficiente assistenza tecnica.

Un affettuoso e caloroso grazie va a tutti coloro che mi hanno sostenuto e confortato, con il loro affetto e la loro amicizia, in questi anni di dottorato, rendendo la permanenza in questo laboratorio più allegra. Ringrazio pertanto Anna, Paola Veragra, Paola Iannelli, Barbara, Francesca, Mary, Lina, Daniela, Adriana, Marianna, Carla, Pasquale, Sergio, Federica, Raffaella, Monica, Mimmo, Erica, Katia, Emanuela e Mariangela.

Una menzione particolare va a mio padre e mio fratello, che hanno condiviso con me le levatacce mattutine, a mia madre, a Mario e a Lina, che mi hanno sopportato e assistito in questi quattro anni, a Fulvia, Flavio e Svetlana, che hanno spesso cercato di animare i miei rientri da Napoli a sera inoltrata, a Maria Carla, a cui non ho potuto dare tutte le attenzioni che avrei voluto offrirle, a tutti i miei parenti e amici, che mi hanno incoraggiato e sostenuto.

Infine ringrazio i miei compagni di viaggio che hanno reso più sopportabile il tragitto Benevento-Napoli.