

## **RUOLO DELLA PROTEINA DI LEGAME ALL'RNA SAM68 NEL CARCINOMA PROSTATICO**

Raffaele Geremia, Claudio Sette

Dipartimento di Sanità pubblica e biologia cellulare, Università degli studi di Roma "Tor Vergata", Italia

### **Identificazione dei complessi ribonucleoproteici formati da Sam68 in risposta al danno al DNA**

Abbiamo effettuato un esperimento di spettrometria di massa per identificare le proteine che associano con Sam68 in cellule tumorali di prostata, LNCaP. Abbiamo identificato le seguenti proteine: PSF, un fattore di *splicing* alternativo che regola anche la trascrizione; p100, un co-fattore trascrizionale che associa con proteine del complesso dello spliceosoma; Nucleolina, una proteina di legame a RNA che regola la trascrizione di geni ribosomali; PabpII, una nuova polyA-binding protein nucleare di funzione sconosciuta.

L'interazione con tre di queste proteine è stata confermata mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione. È in corso la valutazione della loro dipendenza dal danno al DNA. Un risultato di particolare rilievo che abbiamo ottenuto è che p100 stimola fortemente l'attività di *splicing* di Sam68 nei confronti del pre-mRNA di CD44. In particolare, induce l'inclusione dell'esone variabile v5, favorendo una variante di *splicing* di CD44 che correla con il grado di malignità delle cellule neoplastiche.

### **Analisi della risposta post-trascrizionale in cellule di CaP cells in cui la funzione di Sam68 è interferita**

Sam68 regola lo *splicing* alternativo di pre-mRNA per proteine coinvolte nella trasformazione neoplastica come CD44, ciclina D1 e Bcl-x. Abbiamo inizialmente valutato le variazioni dello *splicing* alternativo in risposta al danno al DNA utilizzando il pre-mRNA per CD44 come modello. I nostri risultati mostrano che le isoforme v5, v6 e v7 sono regolate da agenti genotossici. Poiché questi esoni variabili sono indotti da Sam68, stiamo al momento valutando se la presenza di Sam68 (e il suo interattore p100) sia necessaria per questi eventi mediante esperimenti di RNAi.

Analoghi esperimenti sono in corso per Bcl-x e ciclina D1.

### **Analisi delle variazioni di *splicing* di ciclina D1 mediate da Sam68**

Abbiamo dimostrato che la *up*-regolazione di Sam68 induce lo *splicing* alternativo della isoforma ciclina D1b, con maggiore potenziale neoplastico, mentre il silenziamento di Sam68 induce lo *splicing* alternativo della isoforma ciclina D1a, a minore potenziale neoplastico.

Stiamo ora cercando di intervenire per modulare questi eventi di *splicing* alternativo mediati da Sam68 mediante l'espressione di dominanti negativi.

## **Analisi delle variazioni di espressione di miR in cellule in cui Sam68 è interferita**

Abbiamo dimostrato mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione e immunofluorescenza che Sam68 associa con DICER, una RNAsi III necessaria per il processamento dei MIR, e stiamo valutando il ruolo di Sam68 nel processamento di specifici MIR. Abbiamo ottenuto fibroblasti murini embrionali da topi *wild type* o Sam68 KO e abbiamo estratto i MIR da queste cellule. Inoltre, abbiamo silenziato Sam68 mediante RNAi in cellule LNCaP di tumore prostatico e isolati i MIR da esse. Gli RNA ottenuti sono stati inviati alla Exiqon per una analisi comparativa per *microarray* al fine di identificare i possibili MIR regolati da Sam68 in fibroblasti murini e/o in cellule tumorali. Una prima analisi ha rivelato che 12 MIR presentano alterata espressione in cellule *knockout* per Sam68.

### **Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto**

Bianchini A, Loiarro M, Bielli P, Busà R, Baronetto MP, Loreni F, Geremia R, Sette C. Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008 (in corso di stampa).

Cappellari M, Paronetto MP, Vitali R, Sivennoinen O, Geremia R, Sette C. The transcription regulator p100 interacts with Sam68 and modulates the alternative splicing of CD44 in prostate cancer cells. Manoscritto in preparazione.

Paronetto MP, Cappellari M, Vitali R, Knudsen K, Geremia R, Sette C. Sam68 enhances mitogen induced cyclin D1b alternative splicing in prostate cancer cell. Manoscritto in preparazione.

Paronetto MP, Messina V, Bianchi E, Barchi M, Vogel G, Moretti C, Palombi F, Stefanini M, Geremia R, Richard S, Sette C. Sam68 regulates translation of target mRNAs during mouse spermatogenesis. *Nature Cell Biology* Sottomesso.