

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SECONDA FACOLTÀ DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA
BIOMEDICA**

**ASSETTO TRASCRIZIONALE DI
GENI DI INTERESSE IN CELLULE
TUMORALI DEL POLMONE
RESISTENTI A DOCETAXEL**

**Tesi in
BIOCHIMICA**

Relatore

Dott. Emanuele Giordano

Presentata da

Ramona Tomaselli

Correlatore

Dott.ssa Alice Pasini

Sessione II

Anno Accademico 2011-201

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 Brevi cenni sugli acidi nucleici e l'espressione genica.....	1
1.2 Epigenetica.....	5
1.2.1 Modificazioni istoniche.....	6
1.2.2 Il ruolo dell'epigenetica nella malattia neoplastica.....	9
1.3 Il tumore del polmone e trattamento terapeutico.....	10
1.3.1 Cellule staminali tumorali.....	13
1.3.2 Epigen (progetto di ricerca IRST-UNIBO).....	15
1.4 Scopo della tesi.....	17
2. Materiali e metodi	19
2.1 Mantenimento della coltura cellulare.....	19
2.1.1 Linea cellulare utilizzata e trattamento farmacologico	19
2.1.2 Tripsinizzazione per la propagazione della linea cellulare.....	19
2.1.3 Materiali e strumentazione	21
2.1.4 Il problema della sterilità.....	24
2.2 Immunoprecipitazione della cromatina (CHIP).....	25
2.3 PCR ("Polymerase Chain Reaction").....	29
2.3.1 Messa a punto delle condizioni di PCR.....	31
2.4 Elettroforesi su gel di Agarosio.....	34

3. Risultati e discussione	37
3.1 Preparazione della cromatina.....	37
3.2 Marcatori istonici associati a <i>MGMT</i> e <i>CD133</i>	38
3.3 Studio delle modificazioni istoniche del gene OCT4 in condizioni di controllo e sotto pressione farmacologica con Docetaxel.....	43
3.4 Conclusioni.....	47
 APPENDICE	 49
 BIBLIOGRAFIA	 63
 RINGRAZIAMENTI	 65

1 Introduzione

1.1 Brevi cenni sugli acidi nucleici e l'espressione genica

Il termine **genoma** indica la totalità del materiale genetico di un organismo (sia pluricellulare sia unicellulare), composto dal DNA o dall'RNA (come in molti tipi di virus, intesi come entità biologiche). Il patrimonio genetico può essere organizzato in cromosomi ed assicura la trasmissione delle informazioni genetiche.

Le conoscenze sulla struttura e la funzione di acidi nucleici e proteine, hanno permesso di individuare una sostanziale unidirezionalità del flusso dell'informazione, dal DNA, acido desossiribonucleico, alle proteine all'interno della cellula. Tali conoscenze, infatti, condussero Francis H. Crick a formulare il **dogma centrale della biologia molecolare**, il quale stabilisce che l'informazione genetica passa dal DNA, capace di autoreplicazione, all'RNA e da questo alle proteine, la forma "operativa" dell'informazione contenuta nel genoma. Questa affermazione è stata successivamente modificata dalla scoperta dei retrovirus, dove l'RNA funziona da stampo per la sintesi di un DNA complementare.

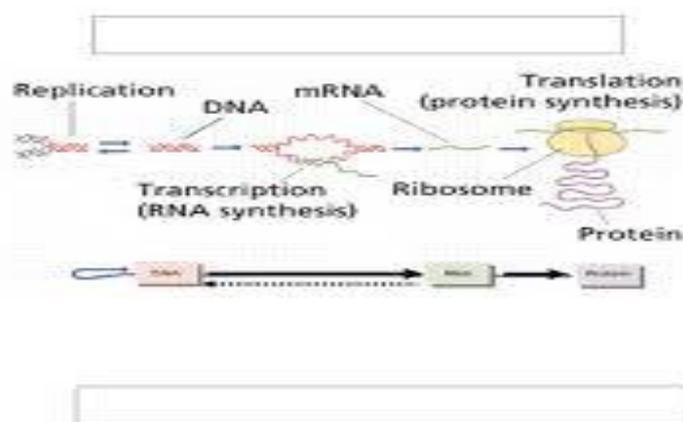


Figura 1: Dogma centrale della biologia molecolare

L'acido desossiribonucleico (DNA) è un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine.

Dal punto di vista chimico, il DNA è un polimero organico costituito da monomeri chiamati nucleotidi (deossiribonucleotidi). Tutti i nucleotidi sono costituiti da tre componenti fondamentali: un gruppo fosfato, uno zucchero pentoso (il deossiribosio nel DNA o il ribosio nell'RNA) e una base azotata (adenina, citosina, guanina, timina - uracile nell'RNA) che si lega allo zucchero con legame N-glicosidico. Il DNA è costituito da due catene elicoidali avvolte intorno ad un unico asse longitudinale per formare la doppia elica destrorsa. Lo scheletro covalente è costituito dall'alternanza di gruppi fosforici e deossiribosio; in pratica, ogni molecola di fosfato forma un ponte molecolare collegando, attraverso legami fosfodiesterici, il carbonio in posizione 3' di una molecola di deossiribosio con quello in posizione 5' dello zucchero successivo. Le basi azotate, distinte in pirimidine (citosina, timina e uracile) e purine (guanina e adenina), a causa della loro natura idrofobica, si dispongono all'interno dell'elica dove vengono stabilizzate da legami idrogeno. Ogni tipo di base presente su un filamento forma un legame con quella posta sul filamento opposto, consentendo l'appaiamento complementare tra due catene di acidi nucleici: l'adenina lega la timina e la guanina lega la citosina. In una doppia elica, la direzione di accrescimento di un filamento è opposta rispetto a quella del filamento complementare: i due filamenti che costituiscono una doppia elica sono antiparalleli. Le estremità asimmetriche di ogni singolo filamento di DNA sono definite 5' (cinque primo) e 3' (tre primo).

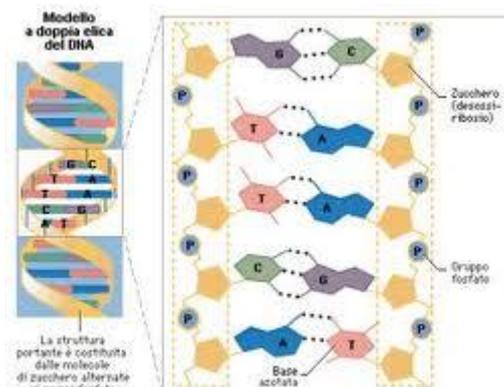


Figura 2: Struttura del DNA

Negli organismi eucarioti, il DNA genomico è localizzato all'interno del nucleo cellulare ed è corredato di meccanismi di **replicazione semiconservativa**, processo nel corso del quale il doppio filamento di DNA parentale funge da stampo per la sintesi di due filamenti figli complementari. Molti dei farmaci chemioterapici svolgono la propria azione durante il processo di replicazione del DNA. Alcuni vengono incorporati nel nuovo DNA, all'interno del quale causano una serie di problemi, mentre altri interferiscono con enzimi necessari al processo di replicazione. I geni corrispondono a sequenze di nucleotidi localizzate in specifiche posizioni in un filamento di DNA e contengono tutte le informazioni necessarie per la produzione di una proteina.

Per questa operazione, inizialmente la sequenza di basi di DNA di un gene è utilizzata come stampo per la sintesi di una molecola di RNA che, nella maggior parte dei casi, viene appunto tradotta in una molecola peptidica. Chimicamente l'RNA è molto simile al DNA. Anch'esso è una catena polinucleotidica contenente quattro nucleotidi diversi. Le molecole di RNA differiscono da quelle di DNA perché:

- contengono lo zucchero ribosio (con un gruppo OH legato al carbonio 2') anziché il deossiribosio;
- una delle basi, la timina (T), è sostituita dall'uracile (U) (in questo caso è l'uracile a legarsi all'adenina);
- sono di solito a singolo filamento, anziché a filamento doppio;

Le molecole di RNA vengono sintetizzate attraverso un processo chiamato **trascrizione del DNA**, dove un filamento di DNA viene copiato nel corrispondente filamento di RNA per mezzo dell'enzima RNA polimerasi. Tale filamento raggiungerà i ribosomi presenti all'interno del citoplasma e attraverso il processo di **traduzione dell'RNA**, darà origine ad una proteina. L'RNA messaggero è il componente fondamentale del sistema di biosintesi delle proteine in quanto contiene la trascrizione delle informazioni presenti nel DNA, relativa al tipo e all'ordine degli amminoacidi che occorre legare nella catena polipeptidica da sintetizzare. A questo processo biologico prendono parte anche altri due tipi di RNA: l'RNA ribosomiale, il costituente più abbondante dei ribosomi e l'RNA transfer, indispensabile per attivare gli amminoacidi e adattarli allo stampo rappresentato dall'RNA messaggero.

Dal punto di vista chimico, una proteina è un polimero di residui amminoacidici, uniti mediante legame peptidico, spesso in associazione con altre molecole e/o ioni metallici (in questo caso si parla di proteina coniugata). Le proteine hanno un'organizzazione tridimensionale (struttura) molto complessa alla quale è associata una funzione biologica specifica. Queste macromolecole, infatti, svolgono la maggior parte delle funzioni cellulari: servono da unità di costruzione per le strutture cellulari, formano gli enzimi che catalizzano le reazioni chimiche della cellula, regolano l'espressione dei geni e rendono le cellule capaci di comunicare fra loro. Le proprietà e le funzioni di una cellula sono determinate quasi interamente dalle proteine che essa è capace di produrre.

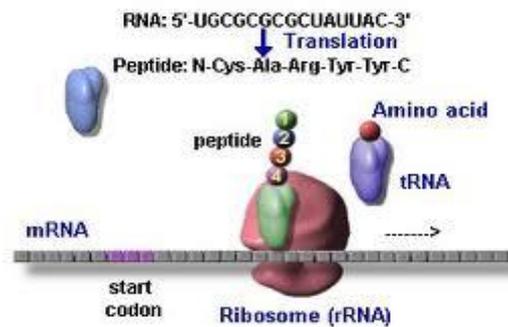


Figura 3: Sintesi proteica

Con il termine **espressione genica** si intende il processo attraverso cui l'informazione contenuta in un gene (costituita di DNA) viene copiata in RNA messaggero per poi essere tradotta in una macromolecola funzionale, tipicamente una proteina, durante il processo di traduzione.

L'espressione genica è profondamente influenzata dall'accessibilità delle informazioni genetiche all'interno del nucleo cellulare, cioè l'organizzazione assunta dalla cromatina, che rappresenta la struttura organizzativa del DNA avvolto sulle proteine istoniche. Dunque, l'organizzazione del DNA nella struttura cromatinica non ha soltanto una funzione di impacchettamento del DNA genomico nel ristretto spazio nucleare, ma risulta intimamente legata ai meccanismi di regolazione dell'espressione genica.

Strutturalmente si distinguono due tipi di cromatina:

- *eucromatina*: è lo stato meno condensato, accessibile ai complessi trascrizionali.
- *eterocromatina*: è la componente più condensata e trascrizionalmente silente.

L'attivazione trascrizionale è, quindi, generalmente preceduta o accompagnata da un locale rimodellamento della struttura della cromatina e da cambiamenti dinamici nelle modalità di condensazione del DNA templato.

1.2 Epigenetica

Negli eucarioti il DNA si trova confinato all'interno del nucleo cellulare ed è diviso in una serie di cromosomi diversi. Ciascun cromosoma consiste di una singola molecola di DNA estremamente lunga associata a proteine che ripiegano il sottile filamento di DNA in una struttura più compatta. Il complesso di DNA e proteine prende il nome di **cromatina**. Le proteine della cromatina sono costituite per l'80-90 % da istoni. Il resto sono proteine non istoniche denominate HMG (High Mobility Group).

Gli **istoni** sono proteine basiche (H1, H2A, H2B, H3 e H4) cariche positivamente, poiché posseggono un gran numero di amminoacidi con catena laterale basica, in particolare lisina e arginina, che risultano protonati in soluzione a pH fisiologico. Gli istoni interagiscono con il DNA, che è carico negativamente a causa dell'abbondanza di gruppi fosfato, per formare strutture dette **nucleosomi**.

Ciascun nucleosoma è formato da 8 istoni attorno ai quali si avvolge 2 volte il DNA. Due nucleosomi adiacenti sono collegati da un tratto di DNA “nudo” detto spaziatore.

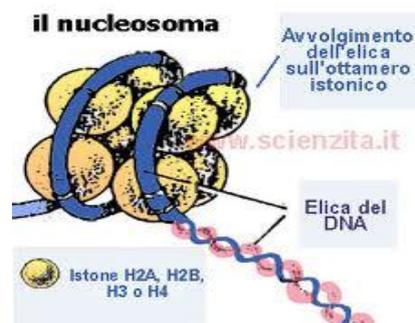


Figura 4: Struttura nucleosoma

L'espressione genica di una specifica regione cromosomica (locus) è influenzata dalla struttura che la cromatina assume presso il locus stesso. Le modificazioni chimiche del

DNA e delle proteine istoniche formano una complessa rete di regolazione che modula la struttura della cromatina e quindi l'accessibilità delle informazioni genetiche.

Con il termine **epigenetica** si intende lo studio di modificazioni chimiche ereditarie del DNA e delle proteine istoniche che influenzano l'espressione dei geni e quindi il fenotipo, senza che siano avvenuti cambiamenti nella sequenza del DNA e quindi nel genotipo.

Gli ultimi anni hanno visto un notevole progresso nella nostra capacità di caratterizzare le modificazioni epigenetiche su scala globale.

Modificazioni epigenetiche si dividono in due categorie principali: metilazione del DNA e modificazioni degli istoni.

Le modificazioni chimiche del DNA e delle proteine istoniche, quali l'aggiunta di gruppi chimici ai residui delle code istoniche o alle basi azotate della regione del promotore di un gene, alterano l'accessibilità fisica al genoma e, conseguentemente, anche il funzionamento dei geni, causandone l'attivazione o il silenziamento (B.E.Bernstein et al., 2007).

1.2.1 Modificazioni istoniche

Uno dei principali meccanismi di rimodellamento della struttura della cromatina è correlato a modificazioni post-traduzionali delle proteine istoniche. Alcune delle modificazioni degli istoni avvengono subito dopo la loro sintesi, ma prima del loro assemblaggio in nucleosomi. Le modificazioni che ci riguardano, però, avvengono una volta che il nucleosoma è stato assemblato.

Gli istoni sono proteine soggette ad una notevole varietà di modificazioni post-traduzionali tra cui: acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione, che influenzano la trascrizione dei geni e la riparazione del DNA (B.E.Bernstein et al., 2007).

La maggior parte di queste modifiche avviene sulla coda N-terminale dell'ottamero, ma talvolta possono avvenire anche nel corpo del nucleosoma, sempre sulle catene laterali degli amminoacidi di un istone.

L'acetilazione della lisina o dell'arginina, che tende ad allentare la struttura della cromatina perché rimuove la carica positiva di questo amminoacido (conseguentemente il DNA, carico negativamente, aderirà meno strettamente agli istoni) avviene per opera dell'istone acetil-transferasi (HAT, histone acetyl transferase). La loro deacetilazione è eseguita dalle deacetilasi (HDAC), mentre la loro (mono) metilazione, dimetilazione o trimetilazione da parte di una serie di tre istone metil-trasferasi, cui corrispondono altre tre demetilasi. Una lisina o un'arginina non possono essere contemporaneamente acetilate o metilate.

L'acetilazione della lisina è un fenomeno comunemente correlato con l'accessibilità della cromatina e con l'attività trascrizionale;

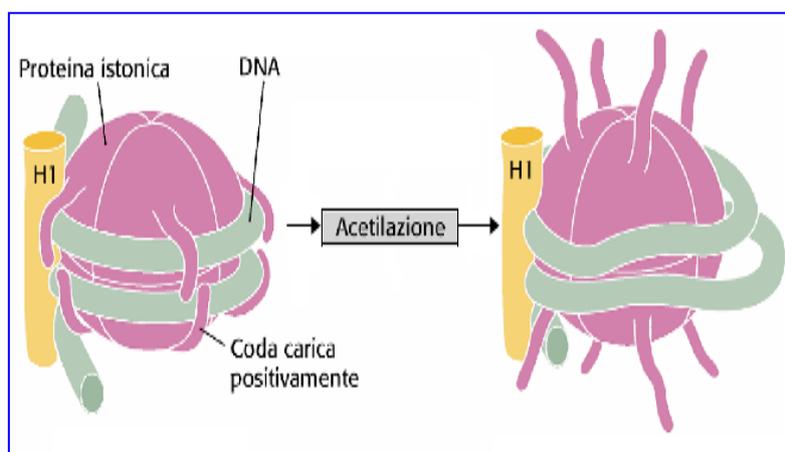


Figura 5: acetilazione istonica

A differenza dell'acetilazione che, quasi senza alcuna eccezione, determina attivazione genica, per il fenomeno di metilazione il discorso diventa più complesso. È stato osservato che specifici pattern di metilazione istonica sono correlati a un aumento o un calo di espressione del gene associato. Lo stato trascrizionale di un gene, nel caso della metilazione istonica, dipende non soltanto da quale residuo viene metilato, ma anche dal numero di gruppi metile trasferiti. Più in dettaglio, la metilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4) e della lisina 36 dell'istone H3 (H3K36) è associata a uno stato trascrizionalmente attivo della cromatina. Al contrario, la metilazione della lisina 9 (H3K9) e della lisina 27 (H3K27) dell'istone H3, e della lisina 20 nell'istone H4 (H4K20) è generalmente correlata con la repressione (B.E. Bernstein et al., 2007).

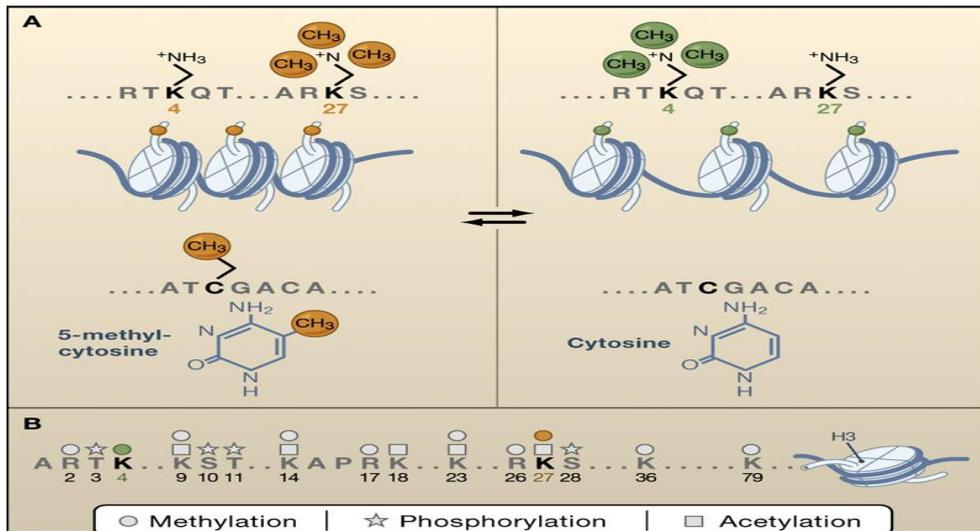


Figura 6: Metilazione della citosina e dell'istone

Le diverse modificazioni istoniche possono influenzarsi vicendevolmente e anche interagire.

Questa complessa serie di informazioni contenute nella cromatina permette di arricchire l'informazione insita nel codice genetico (DNA), alterando in modo stabile e potenzialmente ereditabile dalle cellule figlie l'espressione di un gene, senza modificarne la sequenza nucleotidica (epigenetica). Nel loro insieme i diversi meccanismi epigenetici, che riguardano principalmente la struttura della cromatina, con le sue modificazioni post-traduzionali e la presenza di diversi fattori proteici, e la metilazione del DNA permettono la formazione, negli organismi multicellulari, di tessuti e organi contenenti cellule diversamente differenziate nonostante il medesimo patrimonio genetico. L'importanza di questi meccanismi nel controllare la regolazione dell'espressione genica e, in ultima analisi, il destino di una cellula è dimostrato dal loro sempre più evidente coinvolgimento in diverse patologie umane. Infatti, molto spesso mutazioni a carico di complessi di rimodellamento della cromatina, capaci di modificarne il funzionamento o il reclutamento su specifici loci genici, portano a sindromi genetiche o allo sviluppo di tumori (Jiang et al.,2004)

1.2.2 Il ruolo dell'epigenetica nella malattia neoplastica

L'epigenetica assume un ruolo rilevante per quanto riguarda numerosi campi di ricerca, quali il differenziamento di cellule staminali e la cancerogenesi. Per esempio, in molti tumori vi sono geni che presentano un eccesso o un difetto di metilazione o acetilazione istonica, e si spera che sia possibile intervenire farmacologicamente per correggere queste anomalie, ripristinando una situazione di normalità.

Tra i meccanismi epigenetici che possono portare allo sviluppo di neoplasie, possiamo menzionare sia la repressione di geni, la cui attività è essenziale per contrastare lo sviluppo di un tumore, sia l'attivazione di geni normalmente silenti o meno espressi, la cui elevata trascrizione porta a un'eccessiva proliferazione cellulare. A differenza di mutazioni, le modificazioni epigenetiche, quali la metilazione del DNA e le modificazioni post- traduzionali delle proteine istoniche sono reversibili. La potenziale reversibilità dei cambiamenti epigenetici nelle neoplasie presenta nuove opportunità per la gestione clinica del cancro.

Il silenziamento dei geni che si occupano della riparazione del DNA blocca la riparazione degli errori genetici, aprendo così la strada alla trasformazione neoplastica della cellula (Manel Esteller et al., 2008).

E' evidente quindi, a seconda dei tipi epigeneticamente silenziati nel cancro, che la riattivazione della loro espressione potrebbe avere un profondo effetto antitumorale. Ad esempio, agenti demetilanti come la 5-azacitidina causano la ri-espressione di geni silenziati nelle cellule tumorali.

La metilazione del promotore è un evento epigenetico di solito associata a silenziamento genico e implicato nello sviluppo e differenziamento e spesso deregolamentato nel cancro; poiché molti degli eventi di ipermetilazione nel promotore dei geni si verificano nelle fasi di progressione del tumore, la possibilità di invertire o inibire tali cambiamenti costituisce una grande potenzialità nell'ambito della prevenzione del cancro. Una aberrante metilazione del DNA è stata ripetutamente osservata in neoplasie toraciche, in particolare cancro ai polmoni, carcinoma esofageo, e TETs. Questi risultati forniscono nuove prospettive non solo nei meccanismi molecolari di carcinogenesi, ma consentono anche di identificare biomarcatori candidati per una diagnosi tempestiva e un'accurata prognosi (Chen Chen et al., 2011).

È importante sottolineare come un approccio terapeutico di tipo epigenetico sembra capace di influenzare in modo additivo o sinergico l'efficacia di altri trattamenti, quali una chemioterapia più tradizionale o la radioterapia.

1.3 Il tumore del polmone e trattamento terapeutico

Il corpo di un organismo pluricellulare opera come una società o un ecosistema i cui singoli membri sono cellule, che si riproducono per divisione cellulare e sono organizzate in complessi collaborativi, ossia i tessuti. Perciò, ciascuna cellula si comporta in maniera socialmente responsabile, restando a riposo, dividendosi, differenziando o morendo in base a ciò che è necessario per il bene dell'organismo. La divisione cellulare, infatti, è strettamente controllata da tutta una serie di segnali biochimici complessi che governano l'omeostasi tissutale. La cellula neoplastica è in grado di sfuggire a questi meccanismi di controllo acquisendo un programma autonomo di replicazione. Tale programma è il risultato della mutazione di un particolare set di geni deputati appunto all'orchestrazione della crescita cellulare. Tali geni sono chiamati oncogeni, quando attivano la proliferazione cellulare, o geni oncosoppressori, quando la inibiscono.

Quando il processo di replicazione cellulare si trasforma in una proliferazione incontrollata, dà luogo alla formazione di una massa di tessuto aggiuntivo chiamato tumore. I tumori possono essere benigni o maligni:

- I tumori benigni non sono formati da cellule cancerose, non invadono i tessuti circostanti e non si diffondono ad altre parti dell'organismo. Non mettono quindi in pericolo la vita dei pazienti;
- I tumori maligni sono formati da cellule cancerose in grado di invadere e danneggiare i tessuti e gli organi circostanti. Le cellule maligne possono migrare dal tumore originale e infiltrarsi nel circolo ematico o nel sistema linfatico. Il fenomeno di diffusione del cancro ad altri organi viene chiamato metastasi.

Il tumore del polmone rappresenta quindi la prima causa di morte nei Paesi industrializzati. Solo il 10% dei colpiti sopravvive 5 anni dopo la diagnosi, in

controtendenza rispetto a quanto avviene in altre diffuse neoplasie (seno, prostata...) nelle quali i progressi di diagnostica, chirurgia e chemioterapia hanno notevolmente esteso l'efficacia terapeutica.

Il tumore del polmone provoca una crescita incontrollata di determinate cellule polmonari (quelle che costituiscono bronchi, bronchioli e alveoli) che possono costituire una massa che ostruisce il corretto flusso dell'aria, oppure provocare emorragie polmonari o bronchiali.

Non esiste un solo tipo di tumore al polmone bensì diverse tipologie di malattia a seconda del tessuto polmonare interessato.

I tumori del polmone vengono divisi in: **NSCLS** (No Small Cell Lung Cancer) e **SCLC** (Small Cell Lung Cancer); questi ultimi rappresentano il 16,8% di tutti i tumori polmonari (Travis, 1995).

Tale dicotomia rende conto delle profonde differenze terapeutiche, prognostiche e patogenetiche tra NSCLC e SCLC, configurandosi non solo come criterio di studio classificativo ed epidemiologico, ma anche come indice di mortalità e di speranza terapeutica.

Nell'ambito del NSCLC possiamo ulteriormente individuare:

- Il **carcinoma squamocellulare**: rappresenta il 25-30 per cento dei tumori broncogeni e nasce nelle vie aeree di medio-grosso calibro; è dovuto alla trasformazione dell'epitelio bronchiale provocata dal fumo di sigaretta. È questo il tumore polmonare con la prognosi migliore.
- L'**adenocarcinoma**: si presenta in circa il 30 per cento dei casi e si localizza in sede più periferica e cioè a livello dei bronchi di calibro minore. È il tumore polmonare più frequente tra chi non ha mai fumato e talvolta è dovuto alla presenza di cicatrici polmonari (per esempio per vecchie infezioni tubercolari o per pleuriti). Un sottotipo è rappresentato dall'adenocarcinoma bronchioloalveolare che deriva dalle cellule che tappezzano gli alveoli e che tende a diffondersi lungo le vie aeree.

Il **SCLC** ha un'origine di tipo neuroendocrina e insorge preferenzialmente in sede ilare, con tipico interessamento delle vie respiratorie di calibro maggiore (Harrison, 2006).

Lo sviluppo della massa tumorale è prevalentemente sottomucoso, anche se in alcuni casi possono essere presenti esfoliazioni bronchiali. Le cellule del microcitoma sono caratterizzate da un'elevata conta mitotica, con formazione di gruppi cellulari senza organizzazione squamosa o ghiandolare. Le cellule sono piccole, ovali o rotonde, con margini ben definiti.

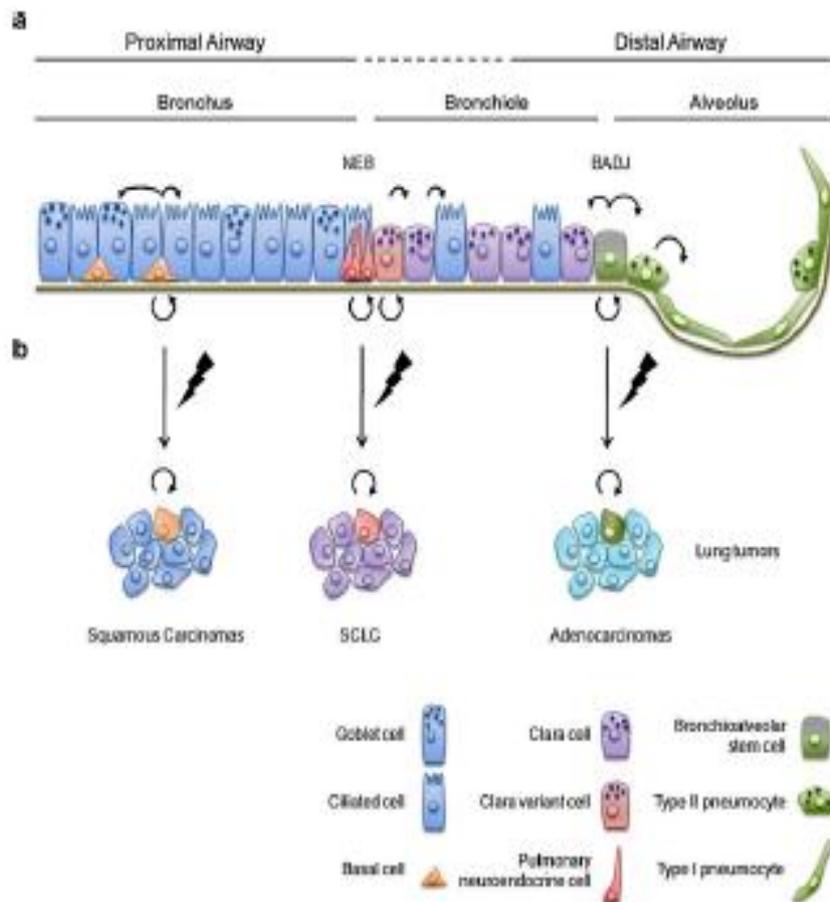


Figura 7: Le varie tipologie di tumore del polmone e la loro localizzazione

La maggior parte dei casi di tumore del polmone, circa il 70%, viene diagnosticato in stadi avanzati di malattia, nei quali l'obiettivo più importante del trattamento rimane tuttora il miglioramento dei sintomi e della qualità di vita, tenendo conto del modesto impatto sulla sopravvivenza che sinora ha ottenuto la chemioterapia sistemica. Per queste considerazioni, è di primaria importanza definire ed adottare un'ottimale terapia di supporto sin dall'inizio del trattamento, in associazione alla terapia sistemica farmacologica specifica.

I derivati del platino (Cisplatino o Carboplatino) sono i farmaci d'elezione nel trattamento del cancro al polmone a piccole cellule. Il cisplatino è un agente chemioterapico antineoplastico in grado di interferire con tutte le fasi del ciclo cellulare legandosi al DNA attraverso la formazione di legami crociati tra filamenti complementari. Spesso vengono associati ad altri farmaci, come ad esempio il Docetaxel e la Gemcitabina.

Anche il Docetaxel interferisce con il processo mitotico legandosi con alta affinità con strutture cellulari chiamate microtubuli. Più specificatamente il trattamento con questo farmaco induce la stabilizzazione dei microtubuli, cioè delle strutture cellulari che consentono la corretta formazione dello scheletro della cellula stessa. Il Docetaxel impedisce la divisione dei microtubuli durante la divisione cellulare, inducendo la morte della cellula stessa.

La resistenza del tumore a questi trattamenti è comune; la chemioresistenza può derivare da meccanismi diversi, come assorbimento di farmaco ridotto, maggiore efflusso di farmaci, riparazione del DNA o apoptosi difettosa (Alice Pasini et al., 2012).

Due linee cellulari del tumore del polmone sono state individuate nell'uomo analizzando le metastasi di un adenocarcinoma (RAL) e di un carcinoma a cellule squamose (CAEP). Queste linee cellulari, derivate da pazienti con una storia clinica nota, possono rappresentare utili modelli sperimentali per studiare la biologia del cancro del polmone e la risposta ai farmaci antitumorali. La loro diversa chemiosensibilità o resistenza, costituisce uno strumento utile per la ricerca in vitro di trattamenti più efficaci. Esse possono fornire validi documenti per valutare i cambiamenti molecolari e citogenetici nelle lesioni precancerose e maligne, e la loro correlazione con specifici cambiamenti morfologici (Anna Gasperi-Campani et al., 1998).

1.3.1 Cellule staminali tumorali

Il tumore polmonare è una patologia molto spesso refrattaria alla terapia e gravata da un alto indice di ricorrenza. Entrambe queste ultime caratteristiche sono state recentemente

imputate al ruolo svolto nell'evoluzione della malattia da una peculiare popolazione di cellule dette staminali tumorali (CST), che sembrano rappresentare la nicchia di resistenza ai chemioterapici tradizionali e l'origine delle forme recidive.

Crescenti evidenze sperimentali, infatti, hanno suggerito che molti tumori, compreso il cancro polmonare, possono essere azionati da una piccola sottopopolazione di cellule auto-rigeneranti che potrebbero sostenere il tumore maligno.

Il modello delle cellule staminali tumorali suggerisce che una sottopopolazione relativamente rara delle cellule tumorali ha la capacità unica di avviare e perpetuare crescita tumorale. Le CSCs (cellule staminali del cancro) sono state individuate e isolate in vari tumori maligni tra i tumori solidi come il cancro del polmone. Queste cellule possono essere definiti come cellule tumorali che specificamente possiedono la capacità di dare origine a tutti i tipi di cellule trovate in un campione particolare di cancro. Le CSCs condividono diverse caratteristiche con le cellule embrionali e staminali somatiche tra cui auto-rinnovamento e differenziazione multipotente.

L'auto-rinnovamento è definita come la capacità di attraversare un numero illimitato di cicli di divisione cellulare mantenendo lo stato indifferenziato. Le cellule staminali sono caratterizzate dalla capacità di rinnovarsi attraverso la divisione cellulare mitotica e differenziarsi in una gamma diversificata di cellule specializzate. Infatti, l'auto-rinnovamento, che guida la cancerogenesi, e la differenziazione anche se aberrante che contribuisce all'eterogeneità cellulare del tumore, sono considerate le proprietà chiave delle CSCs. Popolazioni di cellule staminali sono stabilite in nicchie, che sono definite come luoghi specifici che regolano come queste cellule partecipano alla rigenerazione, manutenzione e riparazione dei tessuti.

La nicchia delle cellule staminali rappresenta il microambiente che interagisce con le cellule staminali. La dipendenza delle cellule staminali dalla nicchia limita la loro espansione. Le CSCs potrebbero sorgere dalle cellule staminali normali che hanno acquisito mutazioni che permettono loro di sfuggire dal controllo di nicchia (Caroline Rivera et al., 2010).

L'esistenza delle cellule staminali tumorali spiega l'auto-rinnovamento e l'eterogeneità del tumore. Un'ipotesi è che i tumori derivino da cellule staminali che hanno acquisito sufficienti mutazioni oncogeniche.

Le implicazioni cliniche sono evidenti: se una terapia non riesce a eliminare tutte le cellule staminali tumorali, le restanti possono “ripopolare” la malattia, provocando una ricaduta del tumore (James P. Sullivan et al.,2010).

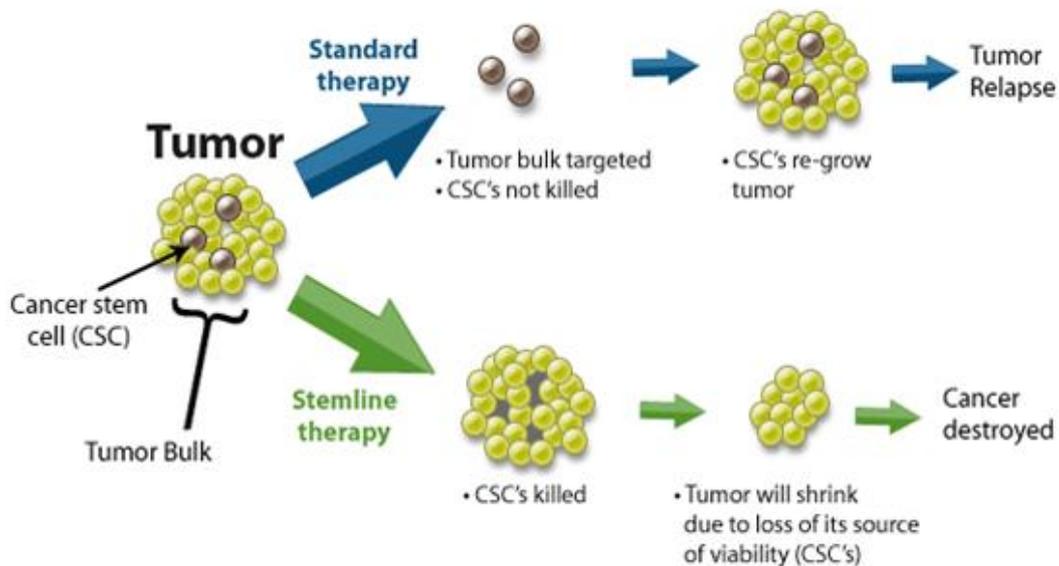


Figura 8: Cancer stem cells (CSCs)

La conoscenza delle CSCs può portare a nuove terapie in grado di eliminare dal polmone le CSCs o indurre la differenziazione di queste cellule.

Modelli promettenti sono stati recentemente sviluppati per isolare la sottopopolazione di CSCs dalla massa tumorale. Questi modelli sono strumenti utili per meglio caratterizzare le CSCs del polmone. Analizzare le CSCs o le nicchie microambientali potrebbe inibire l’azione auto-rigenerante e superare la chemio-radio resistenza (Caroline Rivera et al., 2010).

1.3.2 EPIGEN (progetto di ricerca IRST-UNIBO)

Il 4 novembre 2010, il Comitato Tecnico Scientifico IRST-Unibo, ha presentato il primo “Programma di Ricerca” sviluppato congiuntamente dall’Istituto di Meldola e dall’Università di Bologna con lo scopo di promuovere la ricerca contro il cancro. I temi principali del programma riguardano le cellule staminali tumorali e l’imaging di tipo

clinico. Nel contesto di queste due tematiche, sono quattro i progetti avviati: Epigen, Staminal, Cartoon 3D e Perfect.

Epigen (“Profiling EPIGENetico di marcatori prognostici e bersagli terapeutici nel carcinoma del polmone”) è il progetto che si propone di identificare marcatori epigenetici dell’origine, della progressione e della risposta ai trattamenti, e potenziali bersagli epigenetici della terapia antitumorale, con una particolare attenzione al ruolo imputabile alle CST nel contesto di una popolazione tumorale eterogenea.

Evidenze sperimentali dimostrano che l’aggressività e la resistenza della malattia neoplastica sia legata al comportamento di una popolazione peculiare, fenotipicamente definita, di cosiddette Cellule Staminali Tumorali (CST). Si ritiene che questa popolazione – dotata di una vulnerabilità differenziale agli attuali approcci terapeutici – sia la nicchia cellulare che alimenta il tumore. Infatti, solo le cellule che abbiano longevità e plasticità possono acquisire il numero e la varietà di alterazioni genetiche necessarie per acquistare piena capacità tumorigenica. Le CST possiedono un profilo che le candida come ideali elementi iniziatori di un tumore, che si basa su proprietà come longevità (autorinnovamento), proliferazione (amplificazione della crescita nelle linee derivate) e multipotenza.

Il ruolo postulato delle CST deriva dall’osservazione che, come i tessuti normali, anche il tumore è formato da fenotipi eterogenei di cellule, fra le quali solo alcune possono rigenerarlo: un gruppo di cellule relativamente differenziate, con limitate capacità di proliferazione, forma la maggioranza della massa tumorale e caratterizza la malattia; un gruppo più modesto di cellule meno/non differenziate, rappresentato dalle CST, alimenta la crescita neoplastica. Il risvolto applicativo che fa seguito a questa ipotesi è l’opportunità di indirizzare specificamente la terapia verso la capacità di autorinnovarsi del compartimento delle CST, per determinare l’interruzione della sorgente della ricorrenza nei tumori, in particolare in quelli aggredibili attraverso le terapie convenzionali. Obiettivo di questo progetto è quindi lo studio delle modifiche epigenetiche nel tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC) allo scopo di identificare nuovi fattori molecolari predittivi e prognostici, e di caratterizzare meglio la componente staminale di questi tumori.

Allo stato attuale il gruppo di lavoro coinvolto nel progetto Epigen è riuscito a valutare il profilo di espressione di 36 geni di interesse, come ad esempio geni oncosoppressori

(CDKN2A, DAPK, FHIT, GSTP1, MGMT, RAR β 2, RASSF1A, TIMP3), geni associati alla resistenza a farmaci specifici (BRCA1, COX2, ERCC1, IGFBP3, RRM1, TUBB3) e geni con caratteristiche di staminalità (CD133, OCT4, SLUG) nelle linee cellulari CAEP e RAL. Tale analisi è stata effettuata nella condizione di controllo basale, e dopo trattamento farmacologico a breve termine con docetaxel o gemcitabina. È stato, inoltre, caratterizzato il profilo di metilazione dei geni medesimi per valutare come il profilo di espressione potrebbe essere coerente con questa modifica epigenetica.

Queste informazioni potranno fornire importanti indicazioni aggiuntive sui bersagli e sui meccanismi di azione dei farmaci in uso nella terapia convenzionale dei tumori NSCLC e sulle strategie per migliorarne l'efficacia. Al tempo stesso tali studi potranno fornire nuovi spunti per lo sviluppo di strategie terapeutiche basate su eventuali nuovi bersagli molecolari.

1.4 Scopo della tesi

L'obiettivo del presente lavoro di tesi, che si inserisce all'interno del progetto EPIGEN attualmente in corso, è stato quello di studiare l'assetto trascrizionale di geni coinvolti nella malattia neoplastica polmonare resistenti a docetaxel: *MGMT*, *CD133* e *OCT4*.

In particolare, sono state studiate le modificazioni post-traduzionali di proteine istoniche associate a tali geni per valutare come i profili di espressione e di metilazione potrebbero essere consistenti con tali modifiche. È stato quindi analizzato come i meccanismi di regolazione epigenetici siano in grado di influenzare lo stato di condensazione della cromatina e quindi l'attività trascrizionale.

Nello specifico l'analisi è stata condotta in condizioni basali sui geni *MGMT* e *CD133*, mentre lo studio delle modificazioni post-traduzionali delle proteine istoniche associate al gene *OCT4* è stato svolto non solo in condizioni di controllo basale ma anche in un quadro di resistenza farmacologica al docetaxel per valutare se l'aumento di espressione riscontrato a seguito di trattamento farmacologico sia riconducibile a un rimodellamento della cromatina dovuto a modificazioni istoniche.

O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, *MGMT*, un gene oncosoppressore che ha assunto nell'ultimo decennio un ruolo di particolare importanza nelle neoplasie

cerebrali, permette di produrre una proteina capace di riparare i danni indotti nel DNA. La sua espressione riflette quindi un ruolo che in fisiologia è assolutamente positivo e importante; in presenza di tumore però, l'espressione di MGMT antagonizza gli effetti degli agenti alchilanti, riparando i danni indotti dalla chemioterapia sulle cellule tumorali. Lo stato di metilazione è quindi legato alla capacità di risposta del tumore agli agenti alchilanti, come la temozolomide, un farmaco alchilante orale, di recente introduzione. Diversi studi hanno dimostrato, coerentemente con quanto affermato, che l'assenza di metilazione di questo gene, in presenza di tumore, aumenta il rischio di morte. (Esteller et al., 2000)

OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) è invece un gene di "staminalità" che codifica per un fattore trascrizionale, che ha un ruolo essenziale nell'embriogenesi precoce, e nel mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali umane (Christel Freberg et al., 2007).

CD133 è anch'esso un gene di "staminalità" che aumenta la resistenza del tumore alla terapia farmacologica tradizionale.

Per comprendere come le modificazioni istoniche siano in grado di regolare l'espressione genica rimodellando la struttura della cromatina sono state utilizzate le seguenti tecniche di laboratorio:

- Chromatin immunoprecipitation (ChIP) funzionale allo studio dei marcatori istonici connessi a una specifica regione del genoma.
- Polymerase Chain Reaction (PCR) che consente l'amplificazione di una sequenza specifica di DNA. L'effettiva presenza della sequenza interessata, una volta conclusa l'amplificazione, si valuta attraverso elettroforesi su gel.

I profili di metilazione ed espressione, utilizzati nel seguente lavoro di tesi per lo svolgimento di un'analisi comparativa con i risultati derivati dallo studio dei marcatori istonici, sono l'esito di esperimenti svolti in precedenza dal gruppo di lavoro coinvolto nel progetto EPIGEN.

2 Materiali e metodi

2.1 Mantenimento della coltura cellulare

2.1.1 Linea cellulare utilizzata e trattamento farmacologico

Per lo svolgimento dell'analisi sperimentale è stata utilizzata la linea cellulare CAEP proveniente da carcinoma squamoso. Le linee cellulari sono state coltivate in DMEM / HAM F12 (1:1), integrato con 10% siero bovino fetale, 2 mM L-glutamina (PAA, Pashing, Austria) e insulina (10 mg / mL - SigmaAldrich, Milano, Italia) in un atmosfera umidificata al 95% di aria e 5% di CO₂ a 37 ° C.

Le cellule in fase di crescita esponenziale sono state utilizzate per tutti gli esperimenti.

Per studiare il coinvolgimento del nostro pannello di geni nel processo di resistenza alla chemioterapia, questa analisi è stata effettuata nella condizione di controllo basale e in seguito sotto pressione farmacologica a breve termine con Docetaxel (Sanofi-aventis SpA, Milano, Italia) .

Il Docetaxel è stato aliquotato, conservato a -80° C e prontamente diluito in terreno di coltura prima di ogni esperimento.

Per l'analisi sperimentale il Docetaxel è stato somministrato alla concentrazione di 0.09 µM, valore che corrisponde al 50% della concentrazione inibente (IC50).

2.1.2 Tripsinizzazione per la propagazione della linea cellulare

La sospensione cellulare una volta ottenuta grazie all'uso combinato di mezzi chimici e meccanici viene posta in un contenitore di vetro o di plastica, a fondo piatto (capsula di Petri, fiasca ecc.) con un terreno liquido, che contiene gli ioni necessari a concentrazione isosmotica, aminoacidi e vitamine, e un siero animale in proporzione variabile da una bassa percentuale fino al 50%. In queste condizioni, le singole popolazioni cellulari costituenti la sospensione hanno la possibilità di sintetizzare specifiche glicoproteine di membrana che permettono alla cellula di aderire al substrato,

di cambiare forma e distendersi grazie ad una nuova organizzazione del citoscheletro. Dopo un periodo di tempo variabile, quindi, inizia la divisione mitotica e si sviluppa una **COLTURA PRIMARIA**. L'adesione a un supporto rigido è indispensabile per la crescita delle cellule normali. A causa dell'inibizione da contatto, in una coltura confluyente, le moltiplicazioni cessano e si ha quindi un rallentamento del metabolismo. Per lo svolgimento dell'attività sperimentale è necessario avere sempre a disposizione linee cellulari proliferanti. A tale scopo, ogni 3 o 4 giorni, l'ambiente nel quale vivono le cellule viene ripulito dai residui del metabolismo cellulare e il terreno di coltura viene opportunamente reintegrato operando secondo la procedura di *tripsinizzazione* (Appendice pag.1). Il procedimento consiste nel trattare le cellule con tripsina, un enzima proteolitico che distrugge le proteine di adesione delle cellule. La prolungata esposizione delle cellule a queste sostanze potrebbe provocarne la morte, quindi, appena le cellule si staccano dal fondo della fiasca, l'azione delle sostanze proteolitiche va inibita aggiungendo un opportuno volume di terreno contenente siero, inibitore della tripsina.

2.1.3 Materiali e strumentazione

<u>Nome</u>	<u>Funzione</u>
DMEM	Terreno di coltura
FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Contiene numerosi fattori utili per la crescita delle cellule e non presenti nel terreno di coltura
TRIPSINA	Enzima proteolitico che idrolizza i legami peptidici delle proteine extracellulari che costituiscono il substrato sul quale le cellule sono ancorate (serve per staccare le cellule dalla piastra): la temperatura ottimale per il suo funzionamento è 37°C ma funziona anche a temperatura ambiente (in questo caso occorre far agire per un tempo più lungo)
PIASTRE DI PETRI	Contenitori sterili per la proliferazione cellulare
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Soluzione salina che utilizza il sistema tampone fosfato e viene utilizzata per “lavare” la coltura da prodotti del metabolismo cellulare e/o residui del terreno di coltura, e per il mantenimento temporaneo delle cellule durante i vari test effettuabili. Il PBS mantiene la forza ionica necessaria per il funzionamento delle “pompe di membrana” cellulari mediante il suo contenuto di sodio, potassio e cloro.

Cappa a flusso laminare

La cappa utilizzata è dotata di flusso laminare verticale di classe II di tipo Biohazard (modello VBH prodotta da Steril Spa) ed è concepita per lavorare in ambienti con un rischio biologico basso o moderato. La cappa a flusso laminare elimina la possibilità di contaminazioni crociate, consentendo un lavoro in condizioni di sterilità. Il flusso laminare costante ($0.4 \text{ m/s} \pm 20\%$), monitorato da anemometri, crea una barriera tra interno ed esterno della cappa; questo modello, in accordo con le normative internazionali per la sua classe, fa circolare all'interno della cabina il 70% dell'aria mentre il rimanente 30% viene espulso e rimpiazzato da aria prelevata dall'ambiente circostante. L'aria in ingresso viene aspirata attraverso una griglia posta alla base del piano di lavoro e passando sotto quest'ultimo si unisce all'aria di riciclo, il tutto viene filtrato e reimesso nella camera di lavoro dall'alto. Sia l'aria riciclata sia quella espulsa vengono filtrati da filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 che hanno una efficienza del 99.999% per particelle di 0.3 micron; i due flussi sono regolati da due ventilatori indipendenti. I filtri HEPA sono costituiti da fogli di microfibre di borosilicato, ripiegati più volte per aumentare la superficie filtrante, posti su separatori in alluminio e montati a tenuta con la struttura portante.



Figura 1: cappa a flusso laminare

Cappa chimica

La cappa chimica utilizzata (modello CARBO 900) è una cappa aspirante a filtri di carbone attivo per vapori tossici, inquinanti e aerosol maleodoranti, trattiene nei suoi filtri tutte le molecole dannose alla respirazione e all'ambiente stesso.



Figura 2: cappa chimica

L'Asalair Carbo 900 è una cappa indicata per manipolazioni di sostanze organiche e inorganiche che producono vapori tossici o maleodoranti, trattenendo nei suoi filtri tutte le molecole dannose alla respirazione e all'ambiente stesso.

Incubatore

L'incubatore a CO₂ è un'attrezzatura di precisione per il mantenimento delle cellule in coltura; è costituito da una camera chiusa al cui interno sono ricreate, nei limiti del possibile, le condizioni fisiologiche dei tessuti animali dove le cellule vivevano prima dell'isolamento. Il controllo della temperatura (che deve essere mantenuta costante a 37° C) viene assicurato da un termostato che agisce su una resistenza; un sistema di ventole per la circolazione forzata dell'aria garantisce che la temperatura sia uniforme in tutti i punti della camera. L'aria atmosferica è miscelata con il 5% di CO₂ per mantenere il pH al valore di 7.4.

L'ambiente deve essere saturo in umidità: allo scopo è presente nell'incubatore un vassoio di umidificazione contenente acqua.



Figura 3: incubatore

2.1.4 Il problema della sterilità

Un problema rilevante per il mantenimento di colture cellulari è la sterilità: i terreni di coltura e il siero sono, infatti, molto “appetibili” per batteri, lieviti e funghi che possono facilmente inquinare le colture cellulari. Nello specifico di tale analisi sperimentale il problema è ancora più stringente data l’assenza di antibiotici nel terreno di coltura. Per lavorare in condizioni di sterilità:

- tutte le manipolazioni delle colture cellulari vengono fatte in cappe a flusso laminare provviste di filtri, che limitano la contaminazione occasionale con microrganismi trasportati dall’aria;
- tutti i materiali utilizzati per la manipolazione (pipette, piastre da coltura) sono sterili e di norma monouso;

2.2 Immunoprecipitazione della cromatina (CHIP)

La regolazione genica è un processo complesso. Numerosi fattori sembrano essere richiesti per la precisa regolazione temporale e spaziale di ogni gene.

Capire come tutti questi fattori sono organizzati nel cromosoma e come la loro funzione è regolata *in vivo* è un compito impegnativo.

La tecnica dell'**immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)** è in grado di determinare, dove e come, nel genoma alcuni fattori interagiscono direttamente e indirettamente con il DNA; inoltre questa tecnica permette di mappare i fattori che legano la cromatina e di studiare come questi siano in grado di regolare l'espressione genica rimodellandone la struttura. La tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina ha due principali applicazioni:

- lo studio di ipotetici fattori trascrizionali e delle sequenze di DNA target degli stessi fattori a livello dei promotori.
- lo studio delle modificazioni chimiche covalenti (acetilazione, metilazione, fosforilazione, etc.) e la loro correlazione con alterazioni della struttura cromatinica e dell'attività trascrizionale.

La PCR può quindi essere utilizzata per verificare la presenza o assenza (o relativo arricchimento) di una sequenza predefinita nella cromatina immunoprecipitata. In alternativa, un pannello di primer può essere usato per interrogare un dato locus (B.E.Bernstein et al., 2007).

Per eseguire un esperimento di immunoprecipitazione le cellule devono essere coltivate in modo che un numero sufficiente sia disponibile; ogni saggio Chip richiederà ~ 1-1.5 x 10⁷ cellule.

Prima di eseguire la Chip si ha una fase iniziale di **crosslinking** in cui le proteine istoniche vengono stabilizzate mediante l'utilizzo di un agente di reticolazione, la formaldeide, con conseguente formazione di legami crociati. Infatti, nel caso in cui si intenda studiare l'interazione di una proteina con il DNA si deve ovviamente procedere alla lisi delle cellule. Durante questo passaggio, se l'interazione non è davvero molto forte, la proteina si distaccherà dal DNA, come prevedibile. Per evitare questo fenomeno che precluderebbe qualunque analisi, si effettua il crosslinking: si induce la

formazione di legami covalenti tra DNA e proteina, così che l'interazione resista alle successive manipolazioni.

I vantaggi nell'uso della formaldeide sono molteplici: innanzitutto è solubile in acqua ed è attiva in diverse condizioni saline e di temperatura, inoltre penetra attraverso la membrana biologica velocemente e stabilizza, in modo reversibile, le interazioni molecolari all'interno della cellula (Grunstein et al. 1997).

Le proteine sono normalmente analizzate seguendo un tempo di reticolazione minore di 10 minuti; per tempi più lunghi l'esposizione a formaldeide porterebbe alla perdita di materiale immunoprecipitato. È possibile, infatti, che la reticolazione prolungata favorisca il legame delle proteine associate ai nucleosomi, in modo da mascherare gli epitopi degli istoni.

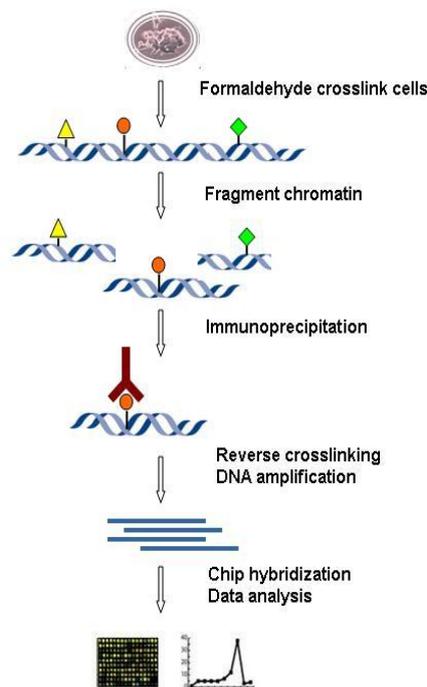


Figura 4: fasi principali di un esperimento di ChIP

Inoltre, la formaldeide è un agente moderatamente denaturante per le proteine ed è noto che possa interferire con la struttura secondaria e, in particolare, con la terziaria, con conseguente dispiegamento della proteina di interesse.

Si procede, quindi, alla frammentazione della cromatina tramite **sonicazione** (si ottengono frammenti di circa 20kb) e per digestione enzimatica.

In laboratorio la sonicazione è normalmente condotta con l'ausilio di un sonicatore, un apparecchio che genera vibrazioni meccaniche amplificate sfruttando corrente elettrica a elevata frequenza prodotta da un generatore.



Figura 5: sonicatore

Tuttavia la sonicazione non produce sempre frammenti abbastanza piccoli di cromatina in corrispondenza delle zone d'interesse. Per questo motivo la cromatina è frazionata mediante incubazione con micrococcal nucleasi (MNase), un enzima che scinde il DNA linker preferibilmente tra i nucleosomi. In particolare, eseguendo digestioni parziali con MNase, è possibile ottenere frammenti di cromatina nativa che coprono da 2 a 3 nucleosomi. I frammenti di cromatina di 400-500 pb possono essere utilizzati per saggi ChIP. I detriti cellulari nel lisato vengono eliminati per sedimentazione e si misura la concentrazione della cromatina con metodo spettrofometrico. Per valutare la concentrazione degli acidi nucleici si sfruttano le loro proprietà di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm.

I complessi proteine-DNA vengono immunoprecipitati selettivamente incubando overnight i campioni di immunoprecipitazione con anticorpi specifici per i fattori trascrizionali o le modificazioni istoniche di interesse. Gli anticorpi si legano alle proteine associate al DNA in modo da isolare il complesso di precipitazione. Per eseguire l'analisi mediante PCR, viene tenuta da parte un'aliquota di cromatina che non è stata immunoprecipitata, come controllo positivo (Input).

Successivamente si aggiungono ai campioni IP delle biglie magnetiche precedentemente legate ad un anticorpo secondario che riconosce quello primario.

Le biglie vengono poi raccolte e sottoposte a 4 lavaggi con i seguenti buffer: Low Salt wash Buffer, High Salt wash Buffer e RIPA Buffer; tali lavaggi consentono di eliminare l'aspecifico e il materiale non legato.

Per l'identificazione e la caratterizzazione di bersagli di DNA *in vivo*, dopo l'immunoprecipitazione della cromatina, il DNA viene purificato e analizzato mediante metodi convenzionali come il Southern-blot e l'analisi di PCR. Tale analisi richiede la rimozione di tutte le proteine dalla frazione di cromatina immunoprecipitata. La rimozione delle proteine è particolarmente importante sia perché tra le proteine sono presenti enzimi in grado di degradare gli acidi nucleici, sia per la presenza di proteine capaci di legarsi agli acidi nucleici impedendone la funzione e/o la purificazione. Per ottenere questo, i campioni vengono prima eluiti con Elution Buffer, in modo da separare i complessi proteina-DNA dalle biglie, e poi incubati a 65°C per permettere la reversione dei "crosslinks" prodotti dalla formaldeide. Inoltre, i campioni vengono incubati con proteinasi K in modo da digerire le proteine. Si procede infine con la purificazione del DNA mediante fenolo/cloroformio.

2.3 PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

La PCR (Polymerase Chain Reaction), o reazione a catena della polimerasi, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere *in vitro* molto rapidamente la quantità di materiale genetico utile per le applicazioni successive.

Un prerequisito indispensabile al realizzarsi della reazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio. Infatti, nella reazione sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (primer) che costituiscono gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi permettendo l'amplificazione della regione bersaglio; un primer è complementare a un filamento di DNA all'inizio della regione bersaglio; un secondo primer è complementare all'altro filamento, alla fine della regione bersaglio. È proprio la scelta degli inneschi oligonucleotidici che si ibridano con ciascuno dei filamenti bersaglio a determinare i limiti del DNA da amplificare. Ciascun ciclo di PCR è costituito da tre stadi che richiedono ognuno pochi secondi:

- **I stadio = FASE DI DENATURAZIONE:** avviene la separazione dei filamenti del DNA stampo contenente la sequenza bersaglio; tale separazione la si ottiene riscaldando il campione a 92°C.
- **II stadio = FASE DI ANNEALING:** comporta l'ibridazione specifica dei due inneschi al DNA complementare; la temperatura ottimale per tale processo dipende generalmente dalla sequenza dei primer stessi.
- **III stadio = FASE DI ALLUNGAMENTO:** la DNA-polimerasi sintetizza la copia complementare di entrambi i filamenti originali che servono da stampo; la temperatura ottimale per tale processo è di circa 72°C, perché la polimerasi utilizzata è tratta da un batterio termofilo (*Thermos Aquaticus*), che cresce normalmente nelle sorgenti calde a temperatura superiore a 80°C (questa DNA-polimerasi – detta Taq – è estremamente resistente alla denaturazione termica e sopravvive allo stadio di denaturazione del DNA a 92°C).

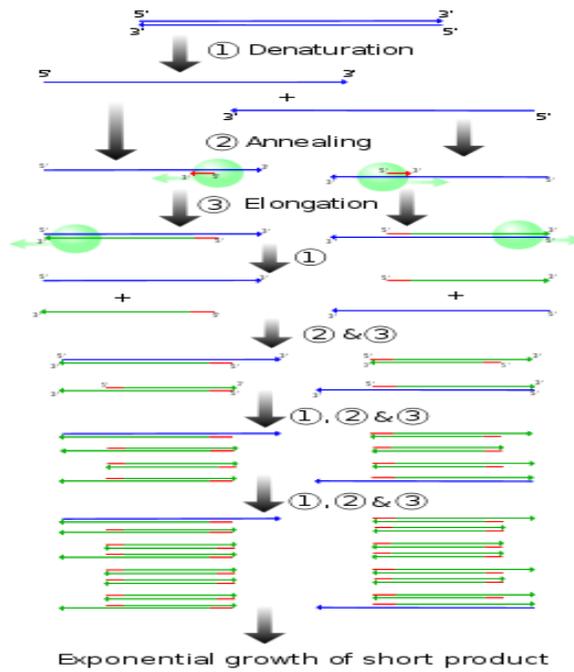


Figura 6: Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Questo processo, oggi automatizzato, è eseguito da strumenti detti thermocycler, che variando velocemente la temperatura permettono di ripetere i cicli di temperatura in tempi veloci.



Figura 7: Thermocycler

2.3.1 Messa a punto delle condizioni di PCR

Per effettuare una reazione di PCR, una piccola quantità di DNA contenente il bersaglio è aggiunta a una provetta con una soluzione che contiene:

- la **DNA polimerasi**: enzima in grado di sintetizzare un filamento di DNA utilizzando come stampo (*template*) un altro filamento di DNA; verrà quindi sintetizzato un filamento di DNA complementare a quello usato come stampo (in direzione 5'- 3' aggiungendo dNTP al gruppo 3'-OH del deossiribosio del nucleotide precedente).
- i **primers**: la concentrazione operativa per i *primer* si aggira attorno ad 2 μM : un simile valore è generalmente sufficiente per almeno 30 cicli d'amplificazione. Una concentrazione di primer troppo elevata potrebbe portare all'amplificazione di sequenze non specifiche, mentre, al contrario, una troppo scarsa presenza di *primer* rende la PCR inefficace.
I *primer* vengono sintetizzati da ditte specializzate in base alla sequenza di DNA alla quale si devono appaiare.
- i **deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs)** forniscono le basi azotate per la sintesi del DNA.
- il **cofattore MgCl_2** : la concentrazione di magnesio è senza dubbio il fattore più critico di tutta la PCR. Questo parametro deve essere fatto oggetto d'una attenta procedura d'ottimizzazione in quanto la presenza di magnesio condiziona l'attività della polimerasi, l'ibridizzazione dei primer e la temperatura di denaturazione del DNA stampo; MgCl_2 non deve essere largamente eccedente poiché in tal caso determinerebbe una perdita di accuratezza, aumentando la frequenza di appaiamento dei primer con sequenze non omologhe.

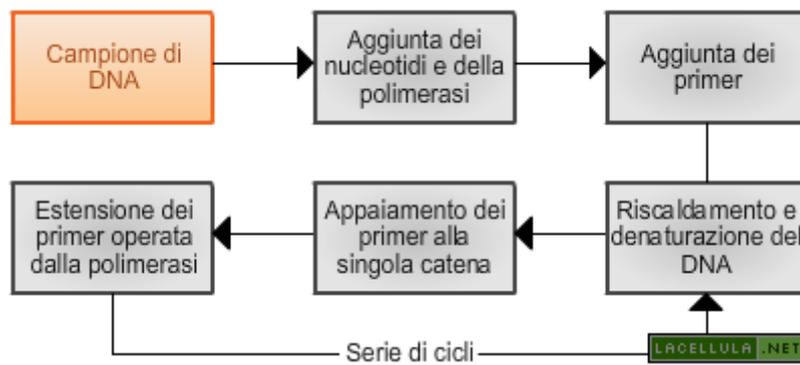


Figura 8: schema di PCR

In una reazione di PCR si ha inoltre l'allestimento d'opportuni controlli di qualità che permettono di valutare la sensibilità e specificità della metodica, nonché di evidenziare la presenza di falsi positivi o falsi negativi. I controlli da utilizzare sono: il controllo positivo e il controllo negativo.

Il controllo positivo consiste in un campione in cui la sequenza bersaglio è contenuta. Tale controllo non dovrebbe contenere un numero di copie di sequenza bersaglio troppo alto (in genere tra 10^5 e 10^6). Ciò al fine di evitare di creare pericolose contaminazioni di altri campioni o di sottostimare eventuali cali di sensibilità della reazione con produzione di falsi negativi. Il controllo negativo consiste in un campione in cui la sequenza bersaglio manca. Esso serve per evidenziare eventuali contaminazioni che potrebbero riferirsi sia all'estrazione del materiale genomico, sia al momento di preparazione della PCR.

Nella fase di *annealing*, in cui i *primer* si appaiano alle sequenze complementari del bersaglio, la temperatura da utilizzare, e la sua durata, devono essere scelti considerando due aspetti opposti. Una temperatura più elevata, infatti, aumenta la specificità della reazione ma ne può pregiudicare l'efficienza poiché favorisce la separazione dei *primer* dal bersaglio (il valore della temperatura a cui si ha il 50% di transizione tra stato a doppia ed a singola elica viene detto temperatura di *melting* o di fusione). Se la temperatura viene abbassata, le condizioni diventano meno stringenti ma viene favorita la formazione di ibridi, e quindi di amplificati, aspecifici.

Una guida utile nel valutare la temperatura di *annealing* da adottare può essere la composizione in coppie GC. Se queste sono poche, allora la temperatura può essere

inferiore ai 55°C, altrimenti deve essere superiore. Una formula empirica per stabilire la temperatura di fusione di un oligonucleotide (*primer*) può essere la seguente:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

(A,G,C,T rappresentano il numero, rispettivamente, di adenine, guanine, citosine e timine)

La temperatura di *annealing* viene, in genere, stabilita sottraendo 5 alla temperatura di fusione calcolata secondo la formula precedente. La temperatura di *annealing* così ottenuta può essere un buon punto di partenza per i primi tentativi d'allestimento della PCR e successivamente potrà essere variata, in prove successive, per cercare di migliorare la resa o minimizzare la presenza d'eventuali prodotti aspecifici.

Generalmente si effettuano circa 30 – 40 cicli: non si superano i 50 cicli in quanto a un certo punto la quota di DNA raggiunge un plateau. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTPs. Bisogna inoltre considerare che si potrebbe amplificare in maniera eccessiva anche eventuale materiale genomico contaminante. Procedendo con le reazioni è possibile amplificare esponenzialmente il numero di filamenti di DNA. L'analisi dei prodotti di amplificazione viene eseguita mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

2.4 Elettroforesi su gel di Agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio consente di verificare la presenza di amplificato determinando l'efficienza dell'amplificazione di ogni coppia di *primer* alle diverse temperature di *annealing* testate. Tale metodologia di laboratorio viene utilizzata per la separazione di molecole cariche in soluzione, che migrano in modo differente in un campo elettrico in base al loro rapporto carica/massa e alla loro struttura 3D. L'apparecchiatura per elettroforesi è composta fondamentalmente da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica e pertanto i cationi migrano verso il catodo (-) e gli anioni verso l'anodo (+) a una velocità che dipende dall'equilibrio tra la forza di spinta del campo elettrico e le forze frenanti (frizionali ed elettrostatiche) esistenti tra ioni e mezzo circostante. La velocità di migrazione del campione dipende da vari fattori:

- il **campo elettrico**: la velocità è direttamente proporzionale al campo elettrico;
- la **carica** del campione: la velocità aumenta all'aumentare della carica netta del campione;
- il **peso molecolare** del campione: la velocità diminuisce all'aumentare del peso molecolare (aumentano le forze frizionali ed elettrostatiche rispetto al mezzo circostante);
- il **tampone**: il tampone non deve legarsi ai composti da separare, perché altererebbe la velocità; inoltre all'aumentare della forza ionica del tampone la quota di corrente trasportata dal tampone aumenta mentre diminuisce la quota di corrente trasportata dal campione, che abbassa quindi la sua velocità di migrazione;
- il **pH**: ha poco effetto sui composti completamente ionizzati, mentre determina il grado di ionizzazione dei composti organici dissociabili; la dissociazione degli acidi organici aumenta all'aumentare del pH, mentre il contrario avviene per le basi organiche.

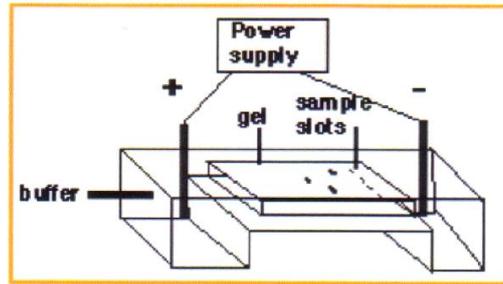


Figura 9: Schematizzazione dell'apparato per elettroforesi

Il gel su cui è condotta l'analisi elettroforetica può essere costituito da agarosio o da poliacrilammide. I gel di poliacrilammide sono usati per separare frammenti di DNA < 500 bp e hanno un'elevata risoluzione, ma sono più complicati e pericolosi da preparare e più difficili da maneggiare rispetto ai gel di agarosio. I gel di agarosio sono semplici da preparare e sono tipicamente usati per separare frammenti di dimensioni variabili da poche centinaia di basi a 20 kb. Essi sono largamente utilizzati per la maggior parte delle analisi di routine sul DNA. L'agarosio è un polimero di carboidrati estratto dalle alghe: i frammenti di DNA, carichi negativamente, migrano verso il polo positivo attraverso il gel, stratificandosi come bande o "zone" distinte in base al proprio peso molecolare. Il gel, che si prepara subito prima dell'uso partendo da agarosio in polvere, è costituito da una maglia che consente di separare le molecole in base al peso molecolare: quelle più piccole attraverseranno più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi. La porosità del gel dipende dalla concentrazione di agarosio, che può essere variata per ottimizzare la migrazione: per discriminare meglio gli alti pesi molecolari si utilizzano percentuali di gel più basse (le maglie del gel risultano, così, essere più rilassate); viceversa, se si usa più agarosio (per esempio il 2%), si osserverà una migliore separazione dei piccoli frammenti, perché anche questi saranno rallentati dalla matrice più concentrata. Per sciogliere l'agarosio, piuttosto che usare acqua distillata, si usano soluzioni tamponate che consentono al DNA di muoversi uniformemente lungo il gel. Il tampone serve, inoltre, per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole da separare, la cui carica cambia con il pH, soprattutto nel caso di ioni dipolari. TAE e TBE sono i tamponi più comunemente usati per l'elettroforesi: T sta per Tris, che consente il mantenimento di un valore costante di pH della soluzione; E sta per EDTA, che chela i cationi divalenti, come il magnesio (la maggior parte delle

nucleasi richiede cationi divalenti per funzionare); A o B sta per acido Borico o Acetico che forniscono l'appropriata forza ionica al tampone.

Dal momento che l'agarosio non è solubile a temperatura ambiente, la soluzione tampone con agarosio in polvere deve essere portata ad ebollizione o in forno a microonde o in autoclave o su un agitatore magnetico: l'agarosio polimerizzerà a temperatura ambiente in 10-15 minuti.

Un pettine immerso nel gel permette di ottenere i pozzetti dove caricare i campioni. Il gel viene posizionato nella camera elettroforetica completamente coperto con il tampone, in modo da consentire la conduzione della corrente. Il campione di DNA, di qualsiasi tipo (estratto, restrizione enzimatica...) è in soluzione acquosa alla quale si aggiunge una sostanza addensante (glicerolo, saccarosio, Ficoll) per impedire che il campione fuoriesca dal pozzetto.

Inoltre, per monitorare la migrazione dei campioni di DNA nel gel, si aggiunge al campione un colorante carico (blu per il bromofenolo).

Per discriminare la lunghezza dei campioni di DNA si utilizza un marcatore di peso molecolare. Questo è composto da una miscela di frammenti lineari di DNA i quali migrano nel gel in maniera nota: è possibile quindi, effettuando un confronto con i campioni, conoscere qualitativamente la lunghezza dei frammenti da studiare. Alla fine della corsa il gel viene rimosso dall'apparecchio di elettroforesi e posizionato su un transilluminatore a luce ultravioletta che permette di visualizzare il DNA, grazie all'utilizzo di molecole fluorescenti che si intercalano alle basi di DNA, come il bromuro di etidio o Gel Star.

3 Risultati e discussione

L'obiettivo degli esperimenti condotti nel corso di questo lavoro di tesi e illustrati di seguito è stato quello di esaminare le modificazioni post-traduzionali di proteine istoniche associate a geni di interesse [*MGMT* (oncosoppressore coinvolto nella riparazione del DNA), *OCT4* e *CD133* (marcatori di staminalità)] in una linea cellulare (CAEP) isolata da carcinoma squamoso del polmone.

In particolare, per ciascuno dei 3 geni sono state analizzate le seguenti modificazioni dell'istone H3: la sua acetilazione globale (acH3) e la tri-metilazione della sua lisina 4 (H3K4me3), associate a uno stato trascrizionalmente accessibile della cromatina, e la tri-metilazione della lisina 27 (H3K27me3), correlata con l'inaccessibilità della cromatina ai complessi trascrizionali.

I risultati di questa valutazione sono stati quindi correlati con i profili di espressione.

Questa valutazione epigenetica ha richiesto l'impiego di tecniche di Immunoprecipitazione della Cromatina (ChIP) e Polymerase Chain Reaction (PCR).

3.1 Preparazione della cromatina

Prima di ogni saggio di immunoprecipitazione le cellule CAEP sono state seminate alla densità di circa 3×10^6 cellule/piastra (15 cm di diametro).

Per lo svolgimento dell'analisi sperimentale, alcune delle piastre seminate sono state mantenute in condizioni di controllo, e le restanti sono state sottoposte a breve trattamento farmacologico con Docetaxel.

Dopo tre giorni di crescita esponenziale, le cellule sono state incubate con formaldeide, un agente che induce legami crociati fra le proteine e i loro ligandi, e successivamente si è proceduto alla frammentazione della cromatina per sonicazione e digestione enzimatica.

Per eseguire la ChIP è stato importante che i frammenti di cromatina ottenuti fossero tra 300 bp e 1000 bp.

Per verificare che la sonicazione e l'incubazione con l'enzima di restrizione *micrococcal nuclease* (MNase) abbiano prodotto frammenti di cromatina alla

risoluzione di singoli nucleosomi, un'aliquota di cromatina non immunoprecipitata, denominata Input, è stata sottoposta a corsa elettroforetica in gel di Agarosio.

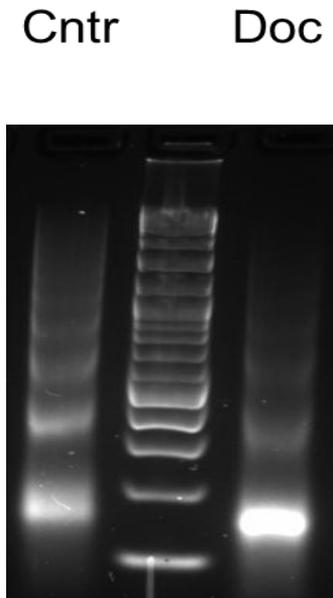


Figura 1: corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% dei campioni di Input per la valutazione dello stato di frammentazione della cromatina

In figura 1, è riportata la corsa elettroforetica dei campioni di Input nelle due condizioni sperimentali testate: il controllo e il trattamento con Docetaxel; insieme ai campioni di Input è stato caricato il marker di peso molecolare per stimare la dimensione media dei frammenti ottenuti.

Come mostrato in figura1, i frammenti ottenuti hanno una dimensione compresa tra 150 e 800 bp

3.2 Marcatori istonici associati a *MGMT* e *CD133*

Lo studio delle modificazioni post-traduzionali delle proteine istoniche associate ai geni *MGMT* e *CD133* è stato condotto in condizioni di controllo basale utilizzando il

protocollo di immunoprecipitazione (ChIP) seguito da un'amplificazione dei complessi di DNA immunoprecipitati tramite PCR.

I prodotti di amplificazione sono stati rivelati mediante migrazione elettroforetica in gel d'agarosio al 2% in tampone TBE addizionato di Gel Star.

Per l'analisi dei marcatori istonici associati al gene *MGMT* sono state utilizzate le sequenze *primer* riportate nella seguente tabella:

Gene	Primer	Sequenza 5'-3'	T Annealing
<i>MGMT</i>	9F	GCCCCTAGAACGCTTTGC	59.5°C
	9R	GAGAGCTCCGCACTCTTCC	

Tabella 1

Per determinare la lunghezza (espressa in coppie di basi; *base pairs*; bp) dei frammenti di DNA ottenuti dall'amplificazione, è stato caricato in gel anche un marcatore di peso molecolare (2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb)). Confrontando la posizione dei frammenti a peso molecolare noto con quella dei frammenti di DNA in esame, è possibile definirne la lunghezza.

E' atteso che i prodotti di *MGMT* amplificati in PCR siano lunghi 109 bp.

Sono stati effettuati 38 cicli di amplificazione e la temperatura di annealing impostata nel thermocycler è stata di 59.5°C: tali scelte sono state effettuate sulla base delle caratteristiche dei primer utilizzati.

È possibile osservare i risultati della corsa elettroforetica dei prodotti di PCR del gene *MGMT* in figura 2:

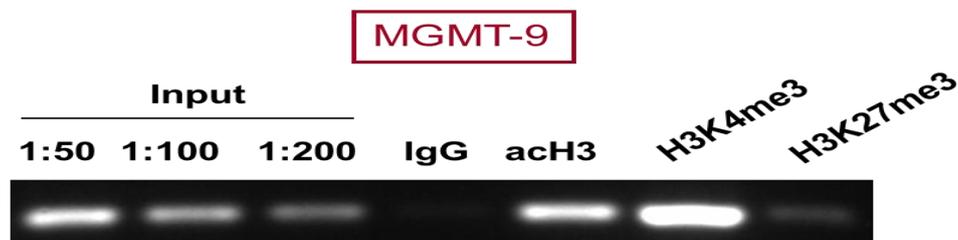


Figura 2: Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% dei prodotti di amplificazione del gene *MGMT* ottenuti mediante PCR dei campioni di DNA derivati dall'esperimento di ChIP.

Come risulta dalla figura 2, il gene *MGMT* presenta un'intensa banda relativa alla trimetilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3K4me3); consistente è anche l'acetilazione istonica (acH3), mentre è pressoché assente la banda associata al marcatore di repressione trascrizionale (H3K27me3).

La specificità della reazione di immunoprecipitazione è stata verificata attraverso l'allestimento di un controllo negativo, realizzato attraverso l'immunoprecipitazione con un anticorpo diretto verso una proteina che non è attesa essere associata alla cromatina nel sito di interesse. A tale scopo è stato utilizzato l'anticorpo policlonale di coniglio anti-IgG (*immunoglobulin G*).

L'assenza della banda associata al controllo negativo è a sostegno della specificità dell'interazione fra l'anticorpo anti-3K4me3 e il sito della cromatina di interesse.

Le prime tre bande in figura 2 corrispondono all'amplificato da diluizioni scalari dell'Input, ovvero della cromatina totale utilizzata per l'immunoprecipitazione.

I primer utilizzati per lo studio dei marcatori istonici associati al gene *CD133*, reperibili in letteratura, sono riportati in tabella 2:

Gene	Primer	Sequenza 5'-3'	TAnnealing
<i>CD133</i>	2F	AGGAATCCTTTCCATTACGG	60°C
	2R	CGGGAGGCAGGAGAAAGG	

Tabella 2

La lunghezza attesa dei prodotti di PCR del gene *CD133* è di 104 bp.

Sono stati effettuati 31 cicli di amplificazione e la temperatura di annealing impostata nel thermocycler è stata di 60°C: tali scelte sono state effettuate sulla base delle caratteristiche dei primer utilizzati.

I risultati relativi alla corsa elettroforetica dei prodotti di PCR del gene *CD133* sono osservabili in figura 3:



Figura 3: Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% dei prodotti di amplificazione del gene *CD-133* ottenuti mediante PCR dei campioni di DNA derivati dall'esperimento di ChIP.

In questo caso, come è evidente nella figura 3, il segnale preponderante è risultato quello relativo alla tri-metilazione della lisina 27 sull'istone H3, mentre piuttosto modesto è il segnale relativo ai restanti marcatori istonici.

Nel complesso le modificazioni istoniche associate al gene *MGMT* sono correlate con una struttura cromatinica apparentemente accessibile ai complessi trascrizionali, e quindi a una probabile espressione del gene associato.

Di converso, il profilo epigenetico caratterizzato per il gene *CD133* predice la sua ridotta espressione.

Effettivamente tali risultati risultano coerenti con i dati di espressione, e di metilazione riportati nelle seguenti figure.

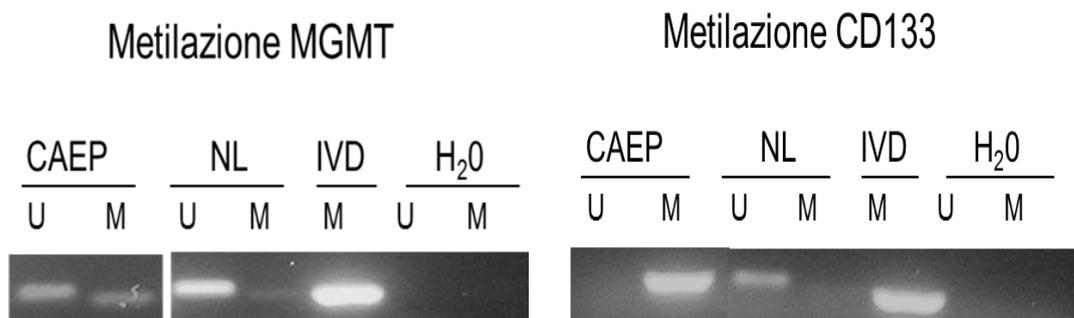


Figura 3: Metilazione di *MGMT*

Figura 4: Metilazione di *CD133*

L'analisi di metilazione eseguita tramite la tecnica della Methylation Specific PCR (MSP) mostra che il gene *MGMT* risulta prevalentemente non-metilato, mentre il gene *CD133* è totalmente metilato.

La metilazione è un fenomeno epigenetico associato a uno stato trascrizionalmente silente della cromatina; ne consegue che i dati di metilazione risultano coerenti con i risultati relativi ai marcatori istonici.

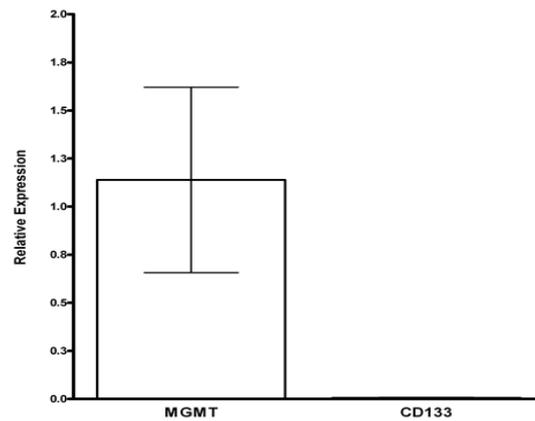


Figura 5: grafico rappresentativo del grado di espressione dei geni *MGMT* e *CD133* in condizioni basali

I dati di espressione, mostrati nella figura 5, evidenziano l'espressione del gene *MGMT* mentre il gene *CD133* appare silenziato, in accordo con le modificazioni istoniche analizzate che correlano con l'attivazione trascrizionale per il gene *MGMT* e il silenziamento genico per il gene *CD133*.

3.3 Studio delle modificazioni istoniche del gene *OCT4* in condizioni di controllo e sotto pressione farmacologica con Docetaxel

L'analisi dei marcatori istonici associati al gene *OCT4* è stata svolta in condizioni basali di controllo e dopo trattamento farmacologico acuto con Docetaxel.

Analisi precedenti del profilo di espressione del gene *OCT4* hanno rivelato che il livello di espressione del gene in cellule trattate con Docetaxel risulta significativamente aumentato rispetto la condizione basale di controllo, come mostrato in figura 6:

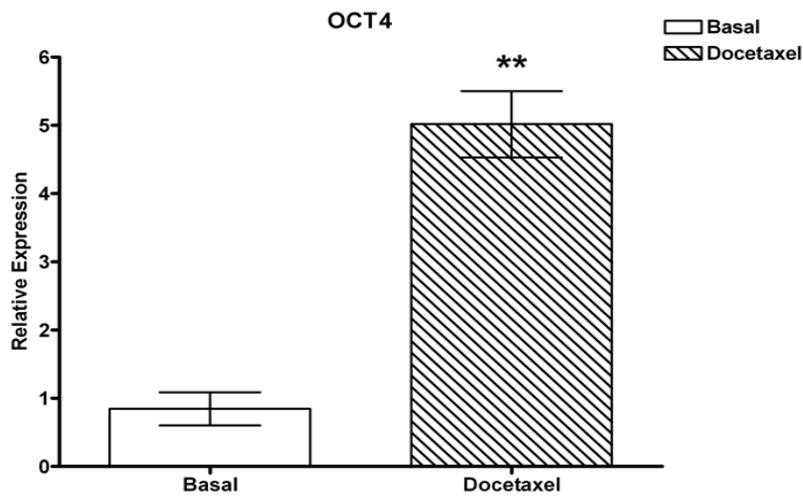


Figura 6: grafico rappresentativo del grado di espressione di *OCT4* in condizioni basali e dopo trattamento farmacologico acuto con Docetaxel

Inoltre, in condizioni di controllo il gene *OCT4*, pur essendo espresso, risulta diffusamente metilato, come mostrato in figura 7.

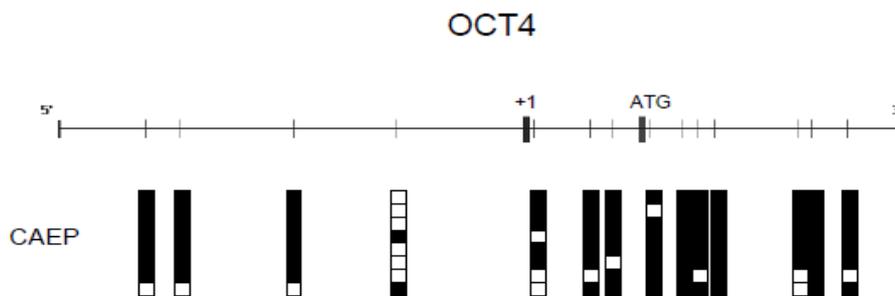


Figura 7: Risultati ottenuti tramite la procedura del Bisulfite Sequencing di *OCT4* in condizioni di controllo basale

Il trattamento con Docetaxel non determina, inoltre, cambiamenti significativi del profilo di metilazione del promotore del gene sopra descritto.

Tali risultati oltre a escludere l'esistenza di una corrispondenza univoca tra espressione genica e stato di metilazione del DNA, suggeriscono il coinvolgimento di meccanismi addizionali di regolazione dell'espressione genica.

A tale scopo nel presente lavoro di tesi è stato effettuato uno studio dei marcatori istonici associati al gene *OCT4* per valutare se l'aumento di espressione del gene, riscontrato a seguito di trattamento farmacologico, sia ascrivibile a un cambiamento dell'assetto trascrizionale della cromatina dovuto a modificazioni delle proteine istoniche.

I primer utilizzati per lo studio dei marcatori istonici associati al gene *OCT4*, reperibili in letteratura, sono riportati in tabella 3:

Gene	Primer	Sequenza 5'-3'	T Annealing
<i>OCT4</i>	1F	AAAGTTTCTGTGGGGGACCT	58°C
	1R	ACTGAGGCGAAGGATGTTTG	

Tabella 3

La lunghezza attesa dei prodotti di *OCT4* amplificati in PCR è pari a 118 bp.

Sono stati effettuati 38 cicli di amplificazione alla temperatura di annealing di 58°C.

I marcatori istonici in condizioni di controllo e di pressione farmacologica con Docetaxel sono stati valutati in tre esperimenti consecutivi.

I risultati relativi alla corsa elettroforetica dei prodotti di PCR del gene *OCT4* per ciascuno degli esperimenti effettuati sono presentati nella figura 8:

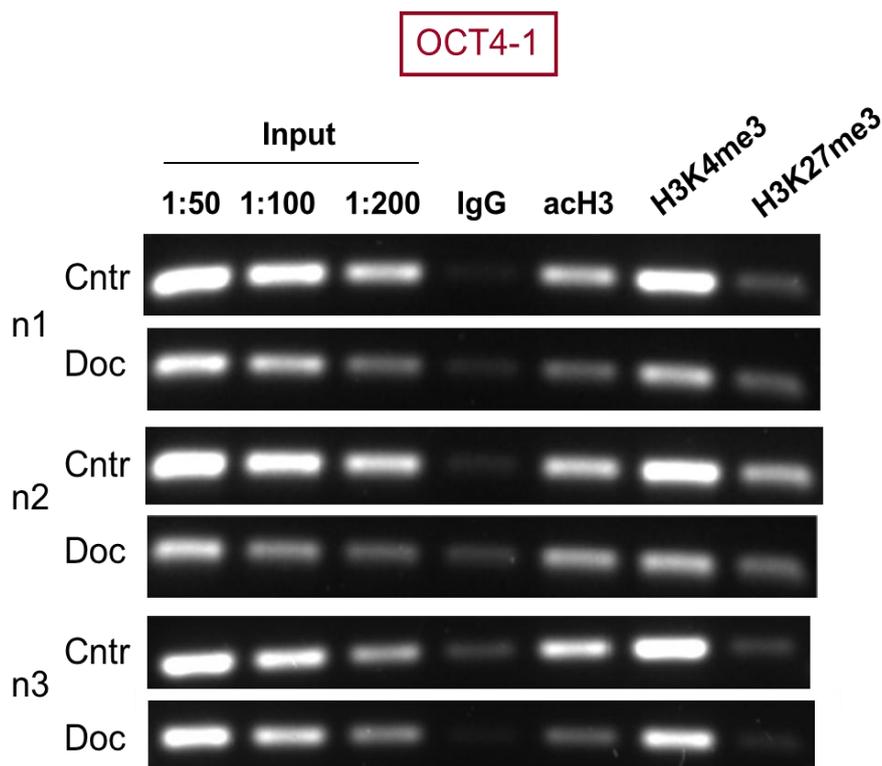


Figura 8: Corsa elettroforetica dei prodotti PCR del gene *OCT4* in condizioni di controllo (Cntr) e dopo trattamento farmacologico acuto con Docetaxel (Doc)

Come mostrato in figura 8, in condizioni di controllo il gene *OCT4* presenta un'intensa banda associata alla tri-metilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3); modesto è il segnale relativo all'acetilazione istonica (acH3), mentre pressochè assente risulta il segnale relativo al marcatore di repressione trascrizionale (H3K27me3).

Nel complesso tali modificazioni istoniche correlano con l'accessibilità della cromatina e una possibile attività trascrizionale, risultando quindi coerenti con il profilo di espressione genica in condizioni basali.

Per ciascuna delle tre condizioni di trattamento, i marcatori istonici non mostrano variazioni significative rispetto alla condizione basale di controllo.

I tre esperimenti condotti risultano paragonabili.

I dati che seguono esprimono sotto forma di istogramma i risultati della ChIP normalizzati rispetto all'Input, nelle due condizioni sperimentali studiate.

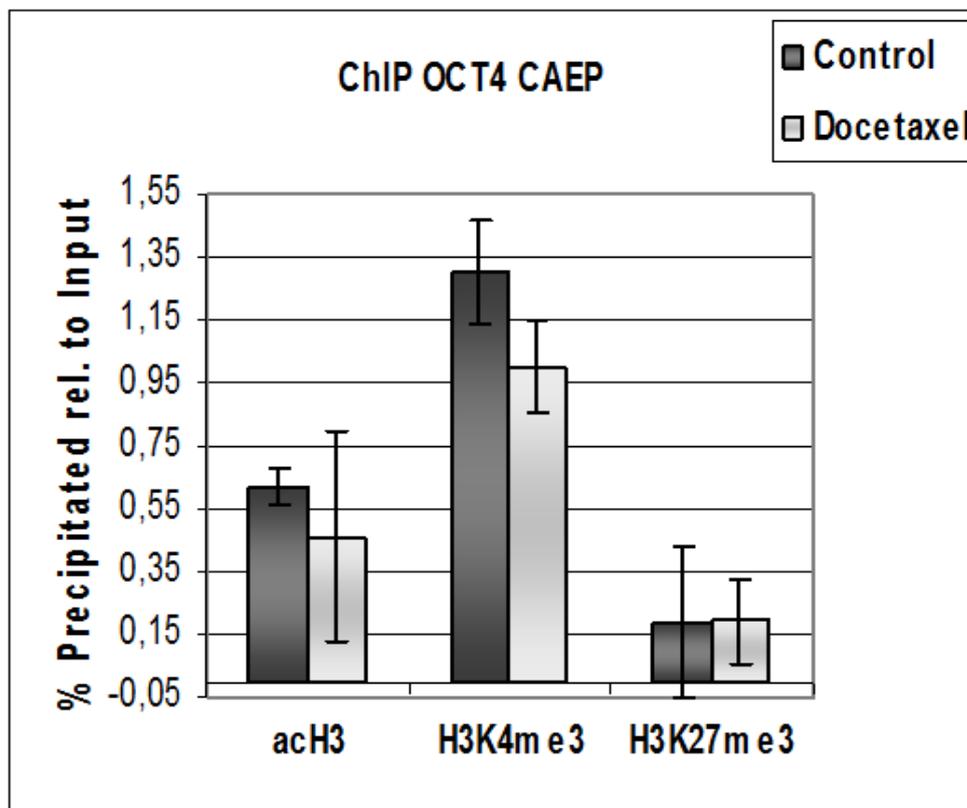


Figura 9: Istogramma relativo ai marcatori istonici associati al gene *OCT4* in condizioni di controllo e di trattamento farmacologico acuto con Docetaxel.

I dati utilizzati per la costruzione dell'istogramma sono stati ottenuti mediante analisi densitometrica delle bande del gel di corsa elettroforetica dei prodotti di PCR, utilizzando un sistema di acquisizione in chemiluminescenza ChemiDoc (Bio-Rad) e il software ImageLab (Biorad).

Come mostrato in figura 9, in condizioni di trattamento farmacologico, il segnale del campione immunoprecipitato con l'anticorpo anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) risulta immutato rispetto la condizione di controllo, mentre si riscontra una leggera, non significativa, riduzione dei livelli dei marcatori istonici che correlano con l'attività trascrizionale (acH3 e H3K4me3).

Nel complesso i dati relativi ai marcatori istonici del trattato risultano pressoché invariati rispetto la condizioni basali di controllo.

Dunque, il profilo epigenetico caratterizzato per il gene *OCT4* non sembra correlare con l'aumento di espressione del gene constatato in condizioni di trattamento farmacologico acuto.

3.4 Conclusioni

Le evidenze sperimentali raccolte in laboratorio mostrano chiaramente come nella storia clinica di una neoplasia contribuisca l'espressione alterata di tipologie di geni che includono, fra gli altri, proto-oncogeni, geni oncosoppressori, geni coinvolti nella riparazione del DNA e geni marcatori di staminalità.

Uno dei meccanismi che contribuiscono alla modulazione dell'espressione genica negli eucarioti riguarda le possibili modifiche post-traduzionali a livello dell'estremità amminotermiale degli istoni (Strahl B. D. et al., 2000); tali modifiche hanno l'effetto di alterare la struttura della cromatina e di creare siti di legame di proteine regolatrici a specifici promotori (Hager G. L. et al., 2006).

Le crescenti informazioni, relative alle modifiche covalenti subite dagli istoni, hanno permesso di definire un "codice" utile per comprendere i meccanismi alla base della regolazione dell'espressione genica e per individuare le regioni del DNA accessibili all'apparato trascrizionale.

La comprensione di tale codice "epigenetico" rappresenta quindi un grado di conoscenza che deve sovrapporsi a quella raggiunta mediante il sequenziamento del genoma.

Il presente lavoro di tesi è stato svolto nel quadro del progetto EPIGEN, una collaborazione attualmente in corso fra l'IRST di Meldola e la II Facoltà di Ingegneria con sede a Cesena, che ha come obiettivo è lo studio delle modifiche epigenetiche nel tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC), allo scopo di individuare marcatori epigenetici dell'origine, della progressione e della risposta ai trattamenti della neoplasia, con una particolare attenzione al ruolo imputabile alle cellule staminali tumorali .

Lo scopo del seguente lavoro è stato quello di studiare l'assetto trascrizionale di geni di interesse, *MGMT* (gene oncosoppressore coinvolto nella riparazione del DNA), *OCT4* e *CD133* (geni di staminalità), appartenenti alla linea cellulare CAEP isolata da carcinoma squamoso del polmone. L'analisi dei marcatori istonici associati a tali geni ha permesso di individuare la correlazione tra profilo epigenetico e il livello di espressione.

Dallo studio effettuato emerge che le modificazioni istoniche associate al gene *MGMT* correlano con l'accessibilità della cromatina ai complessi trascrizionali; tale risultato è coerente con lo status di metilazione e il profilo di espressione genica.

La recente scoperta, in tumori resistenti ai chemioterapici, di piccole popolazioni di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità ha indirizzato verso la caratterizzazione del profilo epigenetico di *CD133* e *OCT4*.

Come emerso dal seguente lavoro di tesi, i marcatori istonici relativi al gene *CD133* risultano associati alla condensazione della cromatina e al conseguente silenziamento genico, in accordo con i profili di metilazione ed espressione genica.

Per quanto riguarda il gene *OCT4*, lo studio delle modificazioni post-traduzionali delle proteine istoniche è stato svolto non solo in condizioni di controllo basale ma anche in un quadro di trattamento farmacologico con Docetaxel per valutare se l'aumento di espressione del gene riscontrato in quest'ultimo caso sia riconducibile a un rimodellamento della cromatina dovuto a modificazioni istoniche.

Dalle analisi effettuate risulta che il profilo epigenetico di *OCT4*, in condizioni di pressione farmacologica, non mostra variazioni significative rispetto la condizione di controllo. Si ritiene, dunque, che l'aumento di espressione del gene *OCT4* riscontrato in cellule trattate, non sia dovuto a meccanismi di regolazione epigenetici, ma al reclutamento di specifici fattori trascrizionali in grado di modulare l'espressione genica.

APPENDICE

1. Protocollo di tripsinizzazione per la propagazione della linea cellulare

1. Riscaldare il terreno e la tripsina a 37°C per attivarla.
2. Aspirare il terreno vecchio aspirandolo da un lato della piastra inclinata.
3. Per eliminare i residui di terreno che contengono l'inibitore della tripsina, lavare la piastra con 3 ml di PBS aggiungendolo su un lato della piastra per evitare di staccare le cellule.
4. Aspirare il PBS.
5. Aggiungere 1 ml di tripsina facendo attenzione di spargerla per tutta la piastra.
6. Incubare per 3-5 minuti a 37°C.
7. Con dei colpetti sul lato esterno della piastra facilitare il distacco delle cellule
8. Aggiungere 3 ml di terreno per bloccare l'azione della tripsina.
9. Raccogliere le cellule aspirando più volte lavando la piastra inclinata per favorire la disgregazione di agglomerati di cellule (se necessario rilavare la piastra con 1 ml di terreno)
10. Centrifugare per 5 minuti a 1200 RPM a temperatura ambiente (circa 20°C).
11. Eliminare il sovrantante.
12. Dare dei colpetti al pellet per risospesione meglio le cellule.
13. Aggiungere terreno al pellet miscelando con la pipetta a seconda del rapporto di diluizione desiderato.
14. Aggiungere le cellule e il terreno di coltura nelle nuove piastre appoggiandosi con la pipetta sul fondo (le quantità dipendono dal rapporto di diluizione delle cellule; per piastre da 9 cm circa 8 ml di terreno e cellule).
15. Agitare per distribuire uniformemente le cellule.

2. Protocollo di semina CAEP per ChIP e incubazione con Docetaxel

Giorno 1

Semina delle cellule CAEP:

1. Preparare 4 piastre da 15 cm per il Controllo, 8 piastre da 15 cm per il Trattato e una piastra da 10 cm per il proseguimento della linea cellulare.
2. Procedere con il protocollo di tripsinizzazione fino al punto 9 (Appendice, pag 1).
3. Centrifugare per 5 min a 1200 RPM a temperatura ambiente (circa 20°C).
4. Dopo la centrifuga aspirare il surnatante e risospendere le cellule in 10 mL di terreno.
5. Preparare due conetti da 1.5mL: in uno aggiungere qualche goccia di cellule ben risospese, nell'altro fare la diluizione desiderata per la conta cellulare prelevando le cellule dal primo conetto (es. se si sceglie un rapporto di diluizione 1:6 aggiungere 25 μ L di PBS e 5 μ L di cellule).
6. Procedere con la conta cellulare con l'emocitometro.
7. Prima della semina aggiungere 12 mL di terreno nelle piastre di controllo e trattato, e 8 mL di terreno nelle piastra per il proseguimento della linea cellulare.
8. Risospendere nuovamente le cellule con micropipetta e seminare le cellule ad una densità di circa 3 milioni di cellule per piastre da 15 cm.

Giorno 2

Incubazione con Docetaxel:

1. Aggiungere Docetaxel 0.09 μ M per piastra di trattato (Stock 1000X, quindi 14 μ L di docetaxel / 14 mL di terreno).
2. Incubare per 1h a 37°C.
3. Aspirare il terreno da tutte le piastre (trattate e controllo) e lavare le piastre con 3 mL di terreno fresco.
4. Aspirare il terreno di lavaggio e aggiungere 14 mL di terreno.
5. Raccogliere le cellule dopo 72h.

3. Protocollo di crosslinking

1. Aggiungere ad ogni piastra formaldeide 37% alla concentrazione finale di 1%, incubare per 10 min a temperatura ambiente mescolando periodicamente:
 - a. 216 μ L di formaldeide 37% per 8mL di terreno, 378 μ L per 14mL;
2. Bloccare la reazione aggiungendo glicina 2.5M (autoclavata) alla concentrazione finale di 0.125M e incubare per 5 min a temperatura ambiente mescolando periodicamente:
 - a. 400 μ L di glicina 2.5M per 8mL iniziali di terreno, 700 μ L per 14mL;
3. Aspirare il terreno, mettere le piastre in posizione inclinata appoggiate a scolare e aspirare;
4. Lavare una volta con PBS, mettendo sempre le piastre in posizione inclinata appoggiate a scolare;
5. Aggiungere Tripsina 0.2X (1X diluita a 0.2X con PBS) ad ogni piastra:
 - a. Usare 2mL per le piastre da 100 mm, 4mL per le piastre da 150 mm;
6. Staccare le cellule con uno scraper portandole in posizione inclinata e raccogliendo tutto su un lato della piastra;
7. Raccogliere le cellule in un tubo da 15 o 50 mL tenuto in ghiaccio;
8. Lavare il fondo della piastra con 2-3 mL di PBS e raccogliere;
9. Centrifugare a ~2000rpm per 5 min a 4°C;
10. Risospendere il pellet con 10mL di PBS e trasferirlo in un tubo da 15mL;
11. Centrifugare a ~2000rpm per 5 min a 4°C;
12. Nel frattempo pesare un conetto vuoto da 1.5mL e preparare in ghiaccio 1mL di PBS completato con Inibitori di Proteasi (950 μ L PBS + 40 μ L PI 25X + 10 μ L AEBSF 100X);
13. Risospendere il pellet di cellule in 1mL di PBS+PI+AEBSF e trasferirlo nel conetto da 1.5mL precedentemente pesato;
14. Preparare una diluizione 1:20 circa per la conta (5 μ L di cellule + 95 μ L di PBS) e contare le cellule (se le cellule sono molto grandi spesso si formano grumi);
15. Nel frattempo centrifugare a ~2000rpm per 5 min;
16. Eliminare il surnatante (se il pellet è piccolo spinnarlo più volte con lo spinner da banco e procedere a eliminare il surnatante in eccesso);

17. Pesare il conetto con il pellet e calcolare il PCV (packet cell volume) in mg come differenza tra i pesi del conetto col pellet e del conetto vuoto;
18. Segnare sul conetto il numero di cellule per mL e il PCV in mg e conservare a -80°C per evitare il degrado delle proteine.

4. Protocollo di immunoprecipitazione della cromatina, ChIP

Giorno 1

Frammentazione della cromatina:

1. Preriscaldare un thermoblock a 37°C riempito di acqua distillata.
2. Accendere il sonicatore, settare l'ampiezza al 30% e la modalità pulsante con impulsi di 1 secondo intervallati da 1 secondo di pausa, per la durata di 25 secondi.
3. Preparare in ghiaccio in un conetto da 1.5mL la soluzione di digestione considerando un volume finale di 800µL, contenente quindi:
 - a. **2x MNase Digestion buffer** pari in µL al peso del PCV in mg;
 - b. **1x MNase Digestion buffer** pari ai µL mancanti per arrivare a 800;
 - c. **PI** (stock 25x) 32µL;
 - d. **AEBSF** (stock 100x) 8µL;
4. Risospendere le cellule con dei colpetti e aggiungere la soluzione di digestione, tenere il campione in ghiaccio.
5. Lavare la punta del sonicatore con H₂O mQ autoclavata e EtOH 70% più volte.
6. Sonicare per 3 volte, 20 impulsi ogni volta, con 1 minuto di pausa in ghiaccio.
7. Lavare la punta del sonicatore con H₂O mQ.
8. Aggiungere al campione MNase (SIGMA N3755) alla concentrazione desiderata tipicamente 4 unità/mL, lo stock è 100 unità/mL, quindi aggiungere 32µL.
9. Vortexare brevemente.
10. Incubare a 37°C per 5 minuti, agitando il campione ogni tanto.
11. Aggiungere **Stop Buffer 10x**, quindi 80 µL.
12. Sonicare per 20 impulsi.
13. Centrifugare il campione a 4°C a 13000 rpm per 30 minuti.
14. Lavare la punta del sonicatore con H₂O mQ e EtOH 70%.
15. Raccogliere il surnatante.
16. Misurare la concentrazione della cromatina con OD260.

17. Procedere con la ChIP e conservare a -80°C la cromatina rimanente. Se si utilizza cromatina conservata a -80°C centrifugarla per 20 minuti a 4°C a 13000 rpm e utilizzare solo il surnatante.

ChIP:

18. Preparare la quantità necessaria di **Low Salt Buffer** addizionata di **PI (25X)** + **AEBFS (100X)** per portare a volume la cromatina a 1.3mL.
19. Aliquotare in tubi da 1.5mL 80-100 μg di cromatina, portare a 1.3mL con **Low Salt Buffer + PI + AEBFS**.
20. Conservare a -20°C anche 10 μg di cromatina, portata al volume di 100 μL con **Low Salt Buffer + PI + AEBFS**, che rappresenta l'**input**.
21. Aggiungere 4-10 μg di anticorpo per IP e ruotare overnight a 4°C . (Di solito si usano 5-6 μg di anticorpo).

Preparare le biglie magnetiche per il giorno 2:

1. Utilizzare 20 μL di Biglie magnetiche proteina G per IP (Dynabeads Prot. G Invitrogen Cat. No. 100.04D).
2. Dopo aver risospeso bene le biglie con dei colpetti, tagliare la punta a un puntale e prelevare le biglie necessarie per le IP desiderate e porle in un tubo da 1.5mL.
3. Posizionare il tubo nel rack magnetico, aspettare circa 20 secondi e aspirare il liquido con una pompa per il vuoto collegata a una pipetta sierologica senza filtro e un puntale.
4. Aggiungere 1ml di blocking solution mixare e posizionare il tubo nel rack magnetico agitando su e giù in modo da raccogliere tutte le biglie.
5. Aspirare il liquido e ripetere il lavaggio con 1mL di blocking solution per una seconda volta.
6. Risospendere le biglie con 1ml di blocking solution e ruotare overnight at 4°C .

Giorno 2

1. Raccogliere le biglie con il rack magnetico e rimuovere il liquido.

2. Risospendere le biglie con 20 * IP μ L di blocking solution.
3. Aggiungere 20 μ l di biglie prebloccate ad ogni campione di IP e ruotare 3 ore a 4°C.

Lavaggi

4. Accendere un thermoblock a 65°C.
5. Posizionare i campioni nel rack magnetico agitando su e giù in modo da raccogliere tutte le biglie e rimuovere il liquido dal tubo e dal tappo.
6. Togliere il magnete.
7. Aggiungere ai tubi **500 μ l** di buffer di lavaggio e agitare i campioni per un minuto.
8. Posizionare i campioni nel rack magnetico agitando su e giù in modo da raccogliere tutte le biglie e rimuovere il liquido dal tubo e dal tappo.
9. Ripetere questa operazione in modo da fare 4 lavaggi con ogni Buffer in questo ordine: **Low Salt wash Buffer, High Salt wash Buffer e RIPA Buffer.**
10. Dopo aver concluso l'ultimo lavaggio spinnare i campioni e raccogliere il liquido rimanente.
11. Aggiungere 100 μ L di **Elution buffer**.
12. Incubare a 65°C per 15 minuti, vortexando brevemente ogni 2 minuti.
13. Scongela l'input e aggiungere 1% SDS (10 μ L stock 10%).
14. Incubare i campioni e l'input overnight a 65°C per eliminare il Crosslinking (coprire i tubi con la stagnola per ridurre l'evaporazione).

Giorno 3

1. Aggiungere 100 μ L di **Elution buffer w/o SDS** a tutti i campioni e l'input, in modo da diluire l'SDS al 0.5%.
2. Aggiungere 1 μ L di **RNase A** 20mg/mL (concentrazione finale 0.1 μ g/ μ L).
3. Incubare a 37°C per 1 h.
4. Aggiungere 4 μ L di **Proteinase K** 10mg/mL (concentrazione finale 0.2 μ g/mL).
5. Incubare a 55°C per 2 hs.

Purificazione del DNA:

1. Preparare dei tubi puliti e nominarli.
2. Aggiungere 5 volumi di Buffer PB ($200\mu\text{L} \times 5 = 1\text{mL}$) e mixare.
3. Posizionare i tubi sul rack magnetico per raccogliere le biglie.
4. Prelevare il surnatante e posizionarlo nelle colonnine QIAGEN (max $750\mu\text{L}$).
5. Centrifugare per 1 min a 10000 rpm.
6. Eliminare il buffer nel tubo di recupero e ripetere l'operazione con il restante campione.
7. Lavare con $750\mu\text{L}$ di Buffer PE. Centrifugare per 1 min a 14000 rpm e eliminare il buffer nel tubo di recupero.
8. Centrifugare per 1 min a 14000 rpm per rimuovere il buffer eccedente.
9. Posizionare la colonnina nei tubi puliti, aggiungere $50\mu\text{L}$ di Buffer EB.
10. Incubare per 1 min a rt e centrifugare per 1 min a 14000 rpm per eluire il DNA.
11. Ripetere con altri $50\mu\text{L}$ di Buffer EB.
12. Usare $5\mu\text{L}$ di DNA per reazione di PCR.
13. Preparare 4 diluzioni di input (1:25, 1:50, 1:75, 1:100) e usare $5\mu\text{L}$ di ognuna per reazione di PCR.
 - a. 1:25 \rightarrow 6 μl Input + 144 μl of PCR H₂O
 - b. 1:50 \rightarrow 50 μl 1:25 + 50 μl of PCR H₂O
 - c. 1:75 \rightarrow 25 μl 1:25 + 50 μl of PCR H₂O
 - d. 1:100 \rightarrow 50 μl 1:50 + 50 μl of PCR H₂O

1:25 spesso è saturo in PCR quindi è meglio preparare:

- e. 1:50 \rightarrow 5 μl Input + (122,5 x 2) μl EB
 - f. 1:75 \rightarrow 100 μl Input 1:50 + 50 μl EB
 - g. 1:100 \rightarrow 750 μl Input 1:75 + 25 μl EB
14. Correre in un gel di agarosio al 2% colorato con Gel Star, $10\mu\text{L}$ di prodotto di PCR e $10\mu\text{L}$ di Input non diluito per controllare lo stato di frammentazione della cromatina.

Soluzioni:

MNase storage solution

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>10 ml</u>
10 mM	1M Tris-HCl, pH 7.5 (autoclavato e filtrato)	100 µl
15 mM	5M NaCl (autoclavato e filtrato)	30 µl
1 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	20 µl
50%	glycerol 80%	6.25
ml		
	mQ H ₂ O	3.6 ml

2x MNase Digestion buffer

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>10 ml</u>
100 mM	1M Tris-HCl, pH 7.5 (autoclavato e filtrato)	1 ml
8 mM	1M MgCl ₂ (autoclavato e filtrato)	80 µl
4 mM	2M CaCl ₂ (autoclavato e filtrato)	20 µl
0.2 %	20% Triton X-100	100 µl
	DEPC H ₂ O	8.8 ml

10X Stop buffer

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>10 ml</u>
100 mM	1M Tris-HCl, pH 7.5 (autoclavato e filtrato)	1 ml
100 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	2 ml
	DEPC H ₂ O	7 ml

Blocking solution

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>50 ml</u>
1x	1x PBS (autoclavato e filtrato)	50 ml
0.5 %	BSA	250
mg		

Elution Buffer 1X

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>10 ml</u>
50 mM	1 M Tris-HCl, pH 8.0 (autoclavato e filtrato)	0.5 ml
10 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	200 µl
1 %	10% SDS (Molecular Biology Grade)	1 ml
	PCR H ₂ O	8.3 ml

Elution Buffer 1X w/o SDS

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>10 ml</u>
50 mM	1 M Tris-HCl, pH 8.0 (autoclavato e filtrato)	0.5 ml
10 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	200 µl
	PCR H ₂ O	9.3 ml

RIPA buffer (filtrarlo)

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>300 ml</u>
10 mM	1M Tris-HCl, pH 8.0 (autoclavato e filtrato)	3 ml
250 mM	1M LiCl ₂ (autoclavato)	75 ml
1 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	0.6 ml
0.5%	20% NP40	7.5 ml
0.5%	10% Sodium Deoxycholate	15 ml
	ddH ₂ O autoclaved	198.9 ml

Low salt Upstate ChIP Dilution Buffer (filtrarlo)

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>500 ml</u>
20 mM	1M Tris-HCl, pH 8.0 (autoclavato e filtrato)	10 ml
150 mM	5M NaCl (autoclavato e filtrato)	15 ml
1 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	1 ml
1%	20% Triton X-100	25 ml
0.1%	10% SDS (Molecular Biology Grade)	5 ml

ddH₂O autoclaved 444 ml

High salt Upstate ChIP Dilution Buffer (filtrarlo)

<u>Final conc.</u>	<u>Stock</u>	<u>300 ml</u>
20 mM	1M Tris-HCl, pH 8.0 (autoclavato e filtrato)	6 ml
500 mM	5M NaCl(autoclavato e filtrato)	30 ml
1 mM	0.5M EDTA (Molecular Biology Grade)	0.6 ml
1%	20% Triton X-100	15 ml
0.1%	10% SDS (Molecular Biology Grade)	3 ml
	ddH ₂ O autoclaved	245.4

ml

Inibitori di proteasi:

Pefabloc SC (AEBSF) stock 100x (100mM)

Roche Cat. No. 11 585 916 001

100 mg in 4.175 ml H₂O mQ

Conservare a -20°C

Complete protease Inhibitor Cocktail (PI) stock 25x

Roche Cat. No. 11 697 498 001

1 pastiglia in 2 ml H₂O mQ

Conservare a -20°C

5. Protocollo di esecuzione della PCR

1. Calcolare le quantità per preparare la Mix da aggiungere ai campioni di DNA, secondo le quantità riportate in tabella:

	Concentrazione Stock	Concentrazione di utilizzo	µl per reazione (20 µl)
Buffer	10X	1X	2
MgCl₂	50 mM	4 mM	1,6
dNTPs	3 mM each (10X)	0,3 mM each	2
Primer S+AS	2 µM each (10X)	0,2 µM each	2
Taq Poly	5 u/µl	0,033 u/µl	0,1

+ 7,3 H₂O (per PCR)

+ 5 DNA

= 20 µl

2. Nominare i tubini per le reazioni;
3. Preparare in ghiaccio la soluzione per l'amplificazione (Master Mix) per un numero di campioni in eccesso seguendo l'ordine della tabella;
4. Dare un breve vortex e spinnare;
5. Dispensare 15 µl di Mix nei tubi di reazione;
6. Dispensare 5 µl di DNA nei tubi di reazione;
7. Spinnare i tubini;
8. Avviare il programma per l'esecuzione della PCR nel termocycler:

Programma:

- ◆ Preheating 105°C (riscaldamento coperchio)
- ◆ 2 min 95°C (attivazione dell'enzima Taq hot-start)
- ◆ 30 sec 95°C (denaturazione)
- ◆ 30 sec 62°C Temperatura di annealing 58-62°C (annealing primer)
- ◆ 30 sec 72°C (annealing Taq)
- ◆ X 36-37 cicli
- ◆ 7 min 72°C (allungamento pezzi incompiuti)
- ◆ (0 sec) 4°C PAUSE

6. Protocollo di preparazione del gel di agarosio (2%) e corsa elettroforetica di amplificati di PCR

1. Preparare Buffer TBE 0,5X: prendere 100 ml di TBE 5X e portare a 1 L con acqua ultrapura

Preparazione buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X

	Per un volume totale di 500 ml	Per un volume totale di 1 l
TRIS	27 g	54 g
Acido Borico	13,8 g	27,6 g
EDTA 0,5 M	10 ml	20 ml

2. Pesare 2,6 g di agarosio e aggiungere 130 ml di Buffer TBE 0,5X: si ottengono così 130 ml di gel al 2%.
3. Chiudere il supporto del gel con il nastro di carta e porvi il pettine.
4. Portare in ebollizione l'agarosio al microonde (1-2 min), poi porre in agitatore a raffreddare.
5. Una volta raffreddato, aggiungere 2,5 µl di colorante GEL STAR, agitare manualmente e poi porre in agitatore.
6. Versare il gel sotto cappa chimica nel supporto e eliminare le bolle.
7. Lasciare 15 min sotto cappa chimica a gelificare.
8. Montare il gel preparato nella cella elettroforetica e levare il pettine.
9. Aggiungere GEL LOADING SOLUTION 6X ai campioni: 4 µl in 20 µl di campione;
10. Caricare 12 µl di campione nei pozzetti e il marker (2.5 µl).
11. Regolare il voltaggio a 120 Volt e lasciare correre i campioni per circa 1 ora.
12. Porre il gel nel transilluminatore per rivelare la presenza delle bande.

BIBLIOGRAFIA

Alice Pasini, Ph. D.; Giulia Paganelli, B. Sc.; Anna Tesei, Ph. D.; Wainer Zoli, Ph. D.; Emanuele Giordano, M.D., Ph.D.; Daniele Calistri, Ph. D., “Specific biomarkers are associated with docetaxel and gemcitabine resistant NSCLC cell lines”, Elsevier Editorial System(tm) for Lung Cancer, 2012.

Anna Gasperi-Campani, Laura Roncuzzi, Luca Ricotti, Laura Lenzi, Rita Gruppioni, Alberto Sensi, Nicoletta Zini, Wainer Zoli, Dino Amadori, “Molecular and Biological Features of Two New Human Squamous and Adenocarcinoma of the Lung Cell Lines”, *Cancer Genet Cytogenet*, 107:11-20,1998.

B.E Bernstein, A. Meissner, E. S. Lander, “The Mammalian Epigenome”, *Cell*, Elsevier Inc., 128: 669- 681, 2007

Caroline Rivera, Sofia Rivera, Yohann Loriot, Marie-Catherine Vozenin, and Eric Deutsch, “Lung Cancer Stem Cell: New Insights on Experimental Models and Preclinical Data”, *Journal of Oncology*, 2010.

Chen Chen , Ni Yin , Bangliang Yin , Qianjin Lu ,” DNA Methylation in Thoracic Neoplasms”, *Cancer Letters* 301 (2011) 7–16.

Christel T. Freberg, John Arne Dahl, Sanna Timoskainen, Philippe Collas, “Epigenetic Reprogramming of OCT4 and NANOG Regulatory Regions by Embryonal Carcinoma Cell Extract”, *Molecular Biology of the cell*, Vol.18, 1543-1553, 2007

Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389:349-352, 1997

Harrison, Principi di Medicina Interna (16^a edizione), New York - Milano, McGraw-Hill, 2006.

James P. Sullivan, John D. Minna, Jerry W. Shay, "Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy", *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010

Jiang, Yong-hui - Bressler, Jan - Beaudet, Arthur L., Epigenetics and human disease, "Annual review of genomics and human genetics", 5, 2004, pp. 479-510.

Manel Esteller, M.D., Ph.D., "Epigenetics in Cancer", *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*, 358:1148-59,2008

Manel Esteller, M.D., Ph.D., Jesus Garcia-Foncillas, M.D., Ph.D., Esther Andion, B.Sc., Steven N. Goodman, M.D., Ph.D., Oscar F. Hidalgo, M.D., Vicente Vanaclocha, M.D., Stephen B. Baylin, M.D., James G. Herman, M.D., "Inactivation of the Dna-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents", *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*, 343, 2000.

Travis, WD, Travis LB, Devesa SS , "Lung cancer", *Cancer* 75 (Suppl. 1): 191–202, 1995

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Dott. Emanuele Giordano per avermi dato la possibilità di conoscere un ambito applicato del tutto nuovo, quale il Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare “S.Cavalcanti”, oltre che per la disponibilità e cortesia dimostratemi durante l’intero percorso di tesi.

Ringrazio la Dott.ssa Alice Pasini per avermi “iniziato” al lavoro di laboratorio, procurandomi tutti gli strumenti necessari affinché potessi svolgere al meglio il lavoro di tesi, ma soprattutto per la pazienza e costanza con cui mi ha seguito in questi lunghi mesi.

Ringrazio i miei genitori non solo per il sostegno economico senza il quale non sarei riuscita a raggiungere questo mio primo traguardo, ma anche per l’amore con cui mi stanno vicini pur essendo lontani condividendo i miei successi come se fossero i propri.

Ringrazio mio fratello e il mio nipotino per le gioie e le risate con cui hanno costellato e alleggerito tutto il mio percorso di tesi.

Ringrazio Livia per essermi stata sempre vicino e per avermi infuso nei momenti più difficili la giusta dose di determinazione con amore quasi “materno”.

Ringrazio Carlo per avermi supportato e in parte sopportato durante il mio lavoro di tesi, ma soprattutto per esser stato il mio punto di riferimento anche quando centinaia di chilometri ci tenevano distanti.

Non per ultimi, ringrazio i miei nonni ma soprattutto nonno Alfredo, a cui dedico il mio lavoro di tesi; spero che possa esser soddisfatto di me e felice del traguardo a cui avrebbe voluto tanto esser presente.

Infine ringrazio tutti quelli che hanno sempre creduto in me, i miei amici, in particolare Francesca, per essere un elemento fondamentale della mia vita.