

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**INIBIZIONE SELETTIVA DELLE
ISTONE-DEACETILASI NELLE CELLULE
NEOPLASTICHE COME APPROCCIO
INNOVATIVO ALLA TERAPIA ANTITUMORALE**

Elaborato in
BIOCHIMICA

Relatore:

Chiar.mo Prof. **Emanuele Giordano**

Presentata da

Denise Della Motta

Correlatore:

Dott.ssa **Alice Pasini**

Sessione III

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

INDICE.....	I
INTRODUZIONE.....	1
1. CENNI SU ESPRESSIONE GENICA E TRASCRIZIONE	1
1.1. Cenni su funzione e struttura delle proteine	1
1.2. Struttura degli acidi nucleici e DNA a doppia elica	3
1.3. Ruolo degli acidi nucleici	7
1.4. Nucleo e ribosomi	8
2. REGOLAZIONE EPIGENETICA DELL'ESPRESSIONE GENICA	10
2.1. Cenni di epigenetica ed espressione genica.....	10
2.2. Cenni sulla metilazione del DNA	10
2.3. DNA e istoni: un complesso sinergico e polifunzionale.....	13
2.4. Modifiche istoniche	18
2.5. Processo di acetilazione istonica e rimodellamento della cromatina.....	19
2.6. Inibitori delle HDAC nella terapia antitumorale.....	24
3. POLIAMMINE E CANCRO	27
3.1. Cenni teorici sulle poliammine	27
4. SCOPO DELLA TESI	32
MATERIALI E METODI.....	35
5. COLTURA CELLULARE	35
5.1. Glia e linea cellulare U87 di glioblastoma umano	37
5.2. Tessuto connettivo e linea cellulare IMR90.....	39
5.3. Terreno di coltura	40
5.4. Piastre di Petri e piastre multipozzetto	40
5.5. PBS.....	41
5.6. Tripsina.....	42
5.7. Cappa a flusso laminare	42
5.8. Incubatore	44
5.9. Microscopio a contrasto di fase	45
6. TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	46
6.1. Alpha-difluorometilornitina, DFMO.....	48
6.2. Scriptaid e coniugati poliamminici	49
6.3. Conta delle cellule e semina	51
6.4. Camera di conta.....	52

6.5.	<i>Modi e tempi di trattamento.....</i>	55
7.	TEST DI VITALITÀ	55
7.1.	<i>Elaborazione dei dati del test di vitalità.....</i>	56
8.	WESTERN BLOTTING	57
8.1.	<i>Raccolta delle cellule, estrazione delle proteine e loro dosaggio.....</i>	57
8.2.	<i>SDS-PAGE.....</i>	58
8.3.	<i>Trasferimento su nitrocellulosa (blotting).....</i>	61
8.4.	<i>Elaborazione dei dati del Western Blotting.....</i>	64
RISULTATI E DISCUSSIONE.....		67
9.	VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEI CONIUGATI POLIAMMINICI SULLA LINEA TUMORALE U87	67
9.1.	<i>Analisi della vitalità.....</i>	67
9.2.	<i>Western Blotting linea cellulare U87.....</i>	68
10.	VALUTAZIONE DELLA SELETTIVITÀ DEL COMPOSTO PC 3 PER LA LINEA TUMORALE U87 A CONFRONTO CON LA LINEA SANA IMR90	71
10.1.	<i>Analisi della vitalità sulle linee cellulari U87 e IMR90.....</i>	71
10.2.	<i>Western Blotting linee cellulari U87 e IMR90.....</i>	72
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....		75
APPENDICE.....		79
11.	PROTOCOLLI	79
11.1.	<i>COMPLETAMENTO DEL DMEM.....</i>	79
11.2.	<i>PRAPARAZIONE DEL PBS.....</i>	79
11.3.	<i>TRIPSINIZZAZIONE.....</i>	80
11.4.	<i>TEST DI VITALITÀ.....</i>	81
11.5.	<i>WESTERN BLOTTING PER L'ANALISI DELL'ACETILAZIONE ISONICA.....</i>	82
11.6.	<i>PREPARAZIONE DEL TBS – TWEEN 20 0.05%.....</i>	91
BIBLIOGRAFIA.....		93
SITOGRAFIA.....		97
RINGRAZIAMENTI.....		99

INTRODUZIONE

1. Cenni su espressione genica e trascrizione

1.1. Cenni su funzione e struttura delle proteine

Quasi tutte le funzioni dinamiche espletate dagli esseri viventi dipendono dalle proteine. Le proteine costituiscono oltre il 50% del peso secco della maggior parte delle cellule e partecipano direttamente a tutte le attività di un organismo. Certe proteine accelerano le reazioni chimiche mentre altre svolgono funzioni di supporto strutturale, di deposito, di comunicazione tra cellule, di movimento e di difesa contro agenti estranei. La vita non sarebbe possibile senza gli enzimi, la maggior parte dei quali sono proteine. Le proteine enzimatiche regolano il catabolismo agendo come catalizzatori, agenti chimici che accelerano in modo selettivo le reazioni chimiche endocellulari senza venirne consumati. In un essere umano sono presenti decine di migliaia di proteine, ciascuna delle quali è caratterizzata da una struttura e da una funzione ben specifiche. Per quanto diverse l'una dall'altra le proteine sono polimeri costituiti dal medesimo gruppo di 20 amminoacidi. I polimeri degli amminoacidi sono detti peptidi. Una proteina è costituita da uno o più polipeptidi i cui ripiegamenti o avvolgimenti determinano una specifica struttura tridimensionale.

Tutti gli amminoacidi condividono la stessa struttura di base. Gli amminoacidi sono molecole organiche contenenti sia gruppi carbossilici sia gruppi amminici (Figura 1).

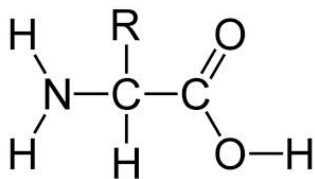


Figura 1: Amminoacido.

Al centro della molecola si trova un atomo di carbonio asimmetrico, detto carbonio alfa (α), perché legato a quattro sostituenti diversi: un gruppo amminico, un gruppo carbossilico, un atomo di idrogeno e un gruppo variabile indicato dalla lettera R. Il gruppo R detto anche catena laterale differisce da un

amminoacido all'altro. Le specifiche attività delle proteine sono il risultato delle loro complesse architetture tridimensionali, il cui livello più semplice è dato dalla catena amminoacidica. Una proteina funzionalmente attiva non è semplicemente una catena polipeptidica, essendo costituita da una o più catene polipeptidiche ruotate, avvolte e ripiegate in modo da formare una macromolecola caratterizzata da una forma tridimensionale, o conformazione peculiare. Nonostante la notevole diversità, tutte le proteine condividono tre livelli di struttura: primaria, secondaria e terziaria. Un quarto livello strutturale, la struttura quaternaria, compare quando la proteina è costituita da due o più catene polipeptidiche.

La struttura primaria di una proteina, definita dalla specifica sequenza amminoacidica, non è determinata dal legame casuale degli amminoacidi ma dall'informazione genetica ereditaria contenuta nel DNA (Figura 2a). Moltissime proteine possiedono segmenti di catena polipeptidica avvolti o ripiegati in modo ripetitivo a formare strutture che contribuiscono alla forma complessiva della proteina. Queste configurazioni, dette strutture secondarie, sono il risultato della presenza di legami a idrogeno a intervalli regolari lungo lo scheletro della catena polipeptidica (non delle catene laterali degli amminoacidi). Due tipiche strutture secondarie sono l'elica α e il foglietto β (Figura 2b). Oltre alla struttura secondaria di una proteina c'è la struttura terziaria la cui forma complessiva risulta dalle interazioni delle catene laterali (gruppi R) dei vari amminoacidi. Quando un polipeptide si ripiega nella sua forma funzionale nativa, gli amminoacidi con catene laterali idrofobe (apolari) di solito si associano nel nucleo interno della proteina, lontano dal contatto con l'acqua. In questa configurazione tra le catene laterali a stretto contatto agiscono forze di van der Waals che contribuiscono a mantenerle vicine. La struttura terziaria è stabilizzata anche dai legami a idrogeno che si formano tra le catene laterali polari, e dai legami ionici tra catene laterali dotate di carica elettrica positiva e negativa. La forma di una proteina può essere ulteriormente stabilizzata dalla presenza di forti legami detti ponti disolfuro, che si formano quando due monomeri di cisteina, un amminoacido che possiede un gruppo sulfidrilico (-SH) nella catena laterale, vengono a trovarsi ravvicinati in conseguenza del ripiegamento della catena polipeptidica. L'atomo di zolfo della cisteina lega quello della seconda formando un ponte disolfuro (-S-S-) che salda le due zone della catena polipeptidica contenenti le due cisteine (Figure 2c e 2d). Certe proteine sono costituite da

due o più catene polipeptidiche aggregate in una macromolecola funzionale. L'aggregazione di queste subunità polipeptidiche determina la struttura quaternaria di una proteina. Esistono aggregazioni di tipo quaternario atte a creare proteine fibrose, come il collagene, oppure globulari, come l'emoglobina (Figura 2e) [Campbell-Reece 2009].

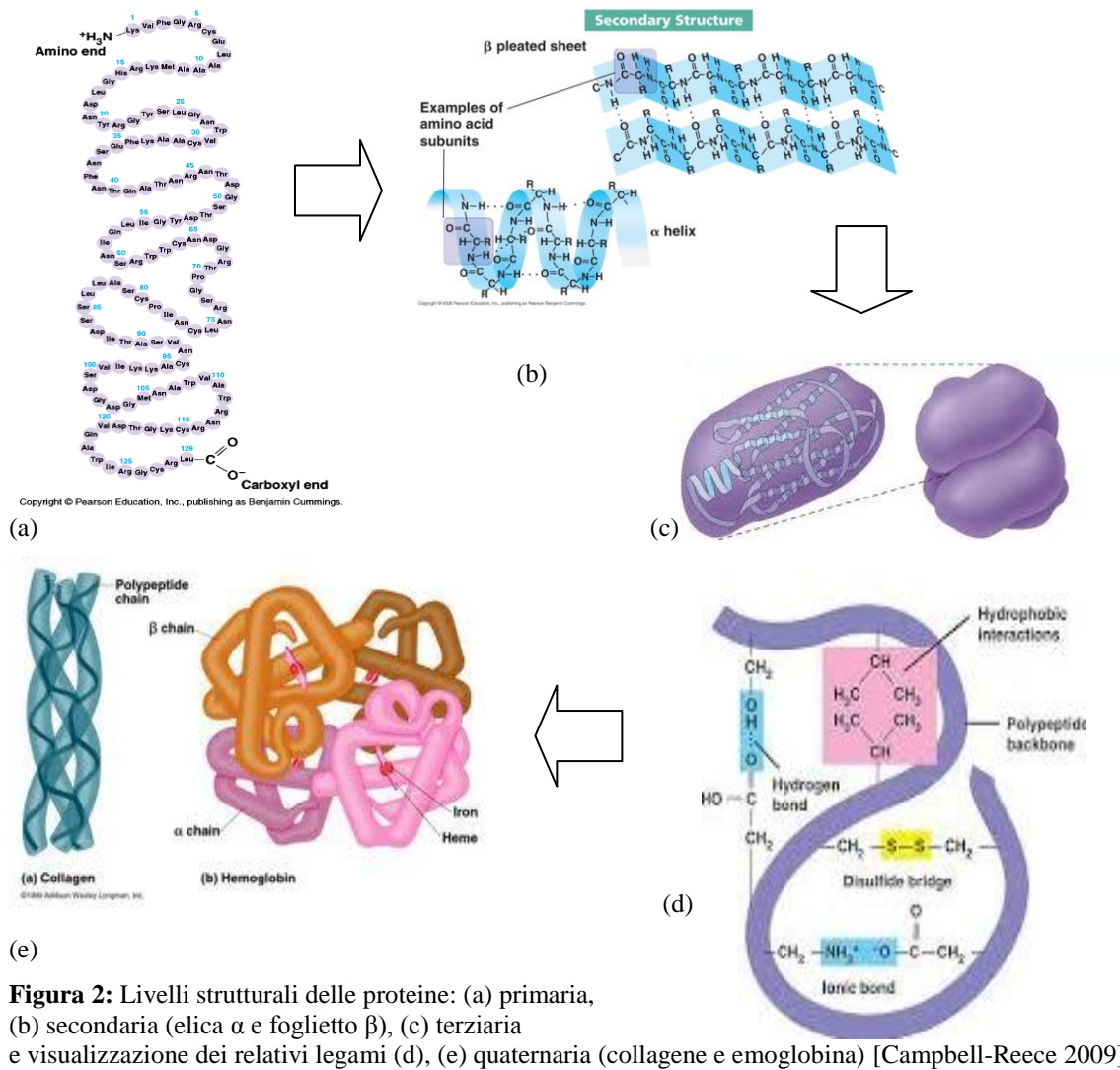


Figura 2: Livelli strutturali delle proteine: (a) primaria, (b) secondaria (elica α e foglietto β), (c) terziaria e visualizzazione dei relativi legami (d), (e) quaternaria (collagene e emoglobina) [Campbell-Reece 2009].

1.2. Struttura degli acidi nucleici e DNA a doppia elica

Gli acidi nucleici, l'acido deossiribonucleico (DNA) e l'acido ribonucleico (RNA), sono macromolecole che esistono come polimeri detti polinucleotidi, costituiti da monomeri

detti nucleotidi. Un nucleotide è composto da tre unità: una base azotata, uno zucchero a cinque atomi di carbonio (un pentoso), e un gruppo fosfato.

Esistono due famiglie di basi azotate: le basi puriniche e le basi pirimidiniche. La molecola della pirimidina è caratterizzata da un anello esatomico costituito da atomi di carbonio e azoto. Gli atomi di azoto tendono a legare ioni idrogeno dalla soluzione, giustificando l'espressione base azotata. I membri delle pirimidine sono le basi azotate citosina (C), timina (T) e uracile (U). Nella famiglia delle purine un anello esatomico si fonde con un anello pentatomico. Fanno parte di questa famiglia l'adenina (A) e la guanina (G). Adenina, guanina e citosina si trovano in entrambi i tipi di acidi nucleici: la timina si trova soltanto nel DNA e l'uracile nell'RNA. Lo zucchero legato alla base azotata è il ribosio nei nucleotidi dell'RNA, il desossiribosio in quelli del DNA (Figura 2). Poiché sono numerati sia gli atomi che formano la base azotata sia quelli che costituiscono lo zucchero, gli atomi dello zucchero vengono distinti dagli altri aggiungendo un indice "primo" (') dopo il numero. Quindi il secondo atomo di carbonio dell'anello dello zucchero occupa la posizione 2' mentre l'atomo di carbonio che si proietta fuori dell'anello è detto carbonio 5'. Un nucleotide è il risultato del legame tra l'atomo di carbonio 5' dello zucchero e un gruppo fosfato. Due unità monomeriche nucleotidiche adiacenti sono legate mediante un legame fosfodiesterico, che si forma quando il gruppo fosfato lega le unità di zucchero di due nucleotidi. Le due estremità libere del polimero così generato sono diverse tra loro; infatti una presenta un gruppo fosfato legato all'atomo di carbonio 5' e un gruppo ossidrile libero sul carbonio 3'. Queste due estremità sono indicate, rispettivamente, come terminale 5' e terminale 3'. È possibile affermare che un filamento di DNA possiede un'intrinseca direzionalità lungo lo scheletro zucchero-fosfato da 5' a 3', analogamente a una strada a senso unico. Lungo questo scheletro si proiettano delle appendici costituite dalle basi azotate. La sequenza delle basi lungo il polimero di DNA (o di mRNA) è peculiare per ogni gene e fornisce alla cellula informazioni molto specifiche. Poiché i geni hanno lunghezza variabile da centinaia a migliaia di nucleotidi, il numero delle possibili sequenze di basi è praticamente illimitato. Il messaggio che ogni gene contiene per la cellula in cui si trova è codificato nella specifica sequenza delle quattro basi del DNA. L'ordine lineare delle basi in un gene codifica la sequenza amminoacidica, la struttura primaria, di una

proteina che, a sua volta, determina la struttura tridimensionale e la funzione che la proteina svolge nella cellula.

Mentre le molecole di RNA sono costituite da una singola catena polinucleotidica come quella mostrata in figura 2, quelle di DNA sono costituite da due filamenti polinucleotidici avvolti a spirale attorno a un asse immaginario a formare una doppia elica (Figura 3). Secondo questo modello i due scheletri zucchero-fosfato sono disposti in direzione 5'→3' opposta l'una rispetto all'altro: una disposizione nota come antiparallela. I due scheletri zucchero-fosfato si trovano all'esterno dell'elica mentre le basi azotate sono appaiate nella parte centrale. Le due catene polinucleotidiche, o filamenti, sono tenute assieme da legami a idrogeno che si formano tra le coppie di basi appaiate e da interazioni di Van der Waals che agiscono tra le coppie di basi impilate. Una lunga molecola di DNA contiene numerosi geni, ciascuno dei quali è localizzato in un particolare segmento della molecola. Nella doppia elica del DNA sono possibili solo specifici appaiamenti di basi: l'adenina si appaia sempre con la timina mentre la guanina con la citosina. I due filamenti della doppia elica sono perciò complementari: la sequenza di ognuno può essere predetta da quella dell'altro. Questa caratteristica del DNA è fondamentale per la trasmissione ereditaria del patrimonio genetico (Figura 4). Quando una cellula si prepara a dividersi, ognuno dei due filamenti di una molecola di DNA funge da stampo per la sintesi del nuovo filamento complementare. Il risultato è la formazione di due copie identiche della molecola originaria di DNA a doppio filamento che vengono ripartite alle due cellule figlie [Campbell-Reece 2009].

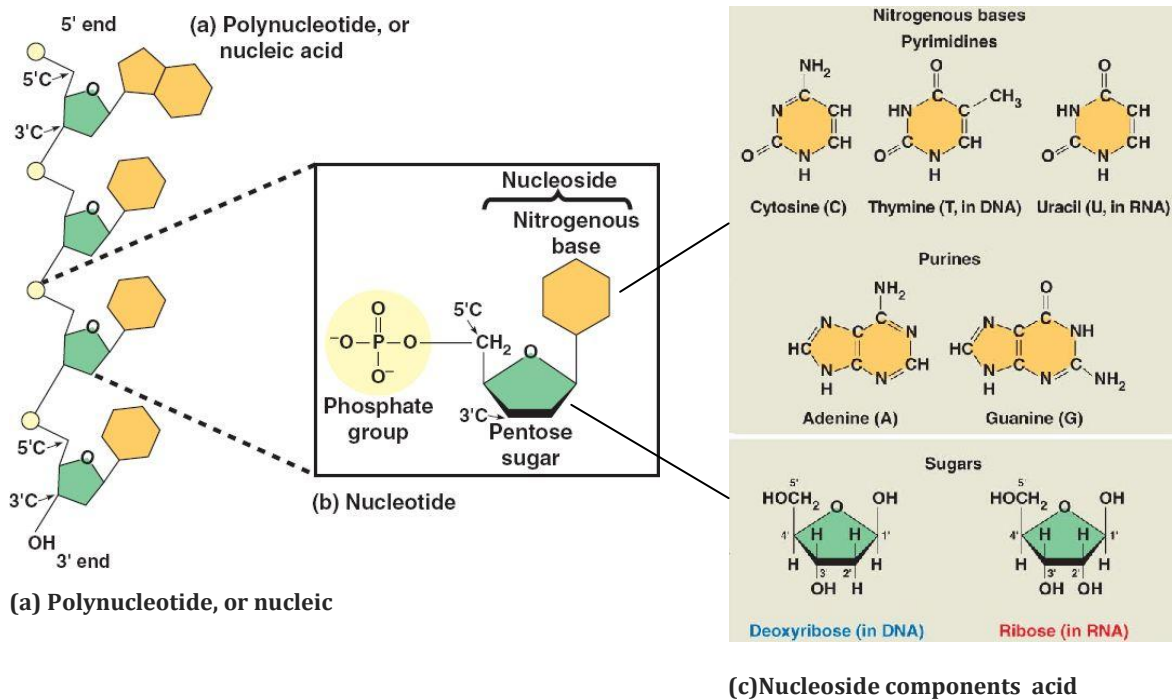


Figura 3: I costituenti degli acidi nucleici. (a) Un polinucleotide è costituito da uno scheletro zucchero-fosfato al quale sono legate molecole di tipo diverso, le basi azotate. (b) Un monomero nucleotidico è costituito da una base azotata, uno zucchero e un gruppo fosfato. In mancanza del gruppo fosfato la struttura è detta nucleoside. (c) Un nucleoside comprende una base azotata (purinica o pirimidinica) e uno zucchero a cinque atomi di carbonio (ribosio o desossiribosio) [Campbell-Reece 2009].

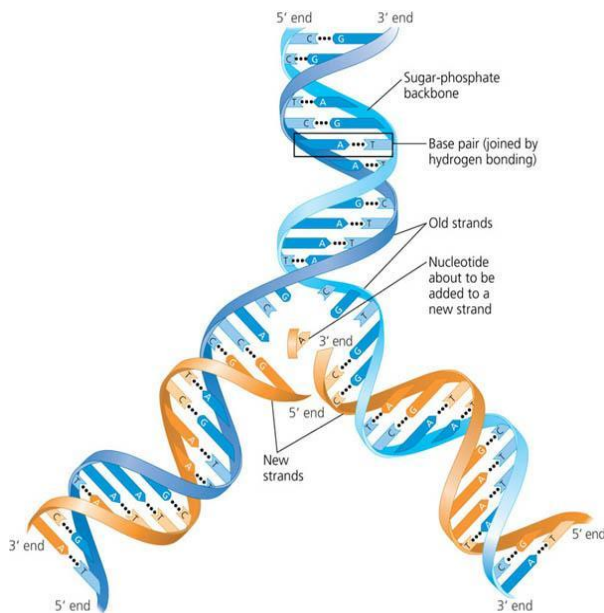


Figura 4: La doppia elica del DNA e la sua replicazione. La molecola di DNA di solito si presenta a doppio filamento con due scheletri zucchero-fosfato delle due catene polinucleotidiche (qui mostrati come due nastri azzurri) all'esterno dell'elica. All'interno, legate ai due scheletri, sono presenti coppie di basi azotate che mantengono associati i due filamenti mediante legami a idrogeno. Come illustrato nella figura con diverse forme per rappresentare le quattro basi azotate, l'adenina (A) può appaiarsi solo con la timina (T), mentre la guanina (G) può appaiarsi solo con la citosina (C). Quando una cellula si prepara a dividersi, i due filamenti della doppia elica si separano e ognuno serve da stampo per il preciso ordinamento dei nucleotidi che vengono uniti a formare il nuovo filamento complementare (in arancio). Ogni filamento di DNA di questa figura è l'equivalente strutturale del polinucleotide illustrato in Figura 2 [Campbell-Reece 2009].

1.3. Ruolo degli acidi nucleici

La sequenza amminoacidica di un polipeptide è programmata in una unità ereditaria detta gene. I geni sono costituiti da DNA, un polimero appartenente alla classe di composti noti come acidi nucleici.

I due tipi di acidi nucleici, l'acido desossiribonucleico (DNA) e l'acido ribonucleico (RNA), permettono agli organismi viventi di riprodurre i loro complessi componenti chimici da una generazione all'altra. Unico tra tutte le altre molecole, il DNA impartisce le direttive per la propria replicazione; il DNA dirige inoltre la sintesi dell'RNA e, attraverso questo, controlla anche la biosintesi delle proteine.

Il DNA è il materiale genetico che gli organismi ereditano dai loro genitori. Ogni cromosoma contiene una lunga molecola di DNA, di solito costituita da diverse centinaia di geni. Quando una cellula si riproduce per divisione, le sue molecole di DNA sono copiate e trasmesse da una generazione di cellule alla successiva. Nella sequenza del DNA sono codificate le istruzioni necessarie per la sintesi di tutte le proteine necessarie alle attività cellulari. Tuttavia il DNA non è direttamente implicato nella realizzazione delle attività della cellula, essendo paragonabile a un archivio di istruzioni e incapace, di per sé, di svolgere azioni. In questo contesto si inseriscono le proteine come elementi indispensabili per la realizzazione dei programmi genetici.

Ogni gene presente in una molecola di DNA codifica per una proteina. I geni sono formati da una sequenza effettivamente codificante il prodotto proteico e da porzioni che presiedono alla regolazione della loro trascrizione. A monte della sequenza codificante è localizzata una regione detta promotore, che integra i segnali che attivano l'RNA polimerasi, ovvero l'enzima che produce la copia di uno specifico gene destinata all'esportazione dal nucleo al citoplasma, sotto forma dell'RNA messaggero (mRNA). Una molecola di mRNA interagisce con il complesso molecolare deputato alla sintesi delle proteine per guidare la costruzione del polipeptide codificato, il quale si ripiega totalmente o in parte a costituire la corrispondente proteina. E' possibile riassumere il flusso di informazione genetica in questo modo: il DNA è trascritto in RNA che viene successivamente tradotto in proteina. La sintesi delle proteine avviene all'interno delle minuscole strutture cellulari chiamate ribosomi. In una cellula eucariotica, i ribosomi si

trovano nel citoplasma mentre il DNA è localizzato nel nucleo. L'RNA messaggero trasferisce le istruzioni genetiche per la costruzione delle proteine dal nucleo al citoplasma (Figura 5) [Campbell-Reece 2009].

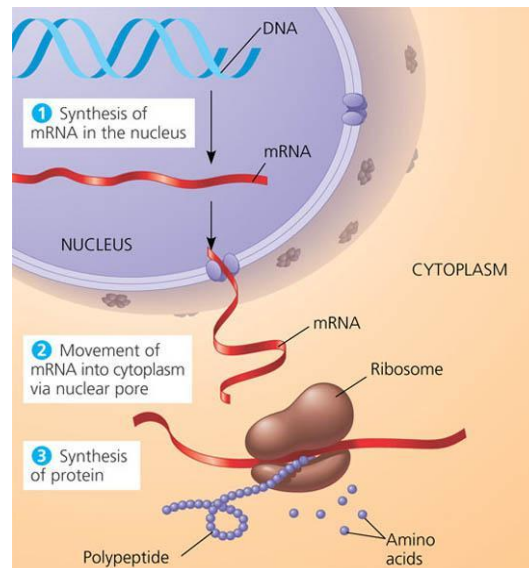


Figura 5: DNA→RNA→proteina. In una cellula eucariotica, il DNA presente nel nucleo programma la produzione citoplasmatica delle proteine determinando la sintesi dell'RNA messaggero (mRNA) [Campbell-Reece 2009].

1.4. Nucleo e ribosomi

Il nucleo e i ribosomi sono gli organelli cellulari coinvolti nel controllo genetico. Il nucleo contiene la maggior parte dei geni presenti nella cellula eucariotica (alcuni geni si trovano nei mitocondri). L'involucro nucleare separa il contenuto del nucleo dal citoplasma. Tale rivestimento è costituito da una doppia membrana; ognuna di queste membrane è composta da un doppio strato lipidico al quale sono associate alcune proteine. L'involucro in questione è perforato da pori ai quali si associa una complessa struttura proteica, denominata complesso del poro, che svolge un ruolo importante regolando l'ingresso e la fuoriuscita della maggior parte delle proteine e delle molecole di RNA, nonché di grossi complessi macromolecolari. All'interno del nucleo il DNA si organizza in unità discrete definite cromosomi, le strutture che recano l'informazione genetica. Ciascun cromosoma è

costituito da un materiale denominato cromatina, un complesso di proteine e DNA. La cromatina è visibile al microscopio ottico come massa diffusa e solo durante la fase di divisione cellulare è visibile sotto forma di unità discrete, appunto i cromosomi. All'interno del nucleo di una cellula che non si trova in fase di divisione si rileva inoltre la presenza di una struttura definita nucleolo: quest'ultimo al microscopio elettronico appare costituito da una massa di granuli molto densi e da materiale fibrillare strettamente associato alla cromatina. A livello del nucleolo, sulla base delle istruzioni contenute nel DNA, viene sintetizzato un particolare tipo di RNA detto RNA ribosomiale. Nel nucleolo le proteine provenienti dal citoplasma vengono assemblate con l'RNA ribosomiale costituendo le subunità ribosomiali maggiore e minore. Successivamente, tali strutture attraversano i pori nucleari, fuoriescono dal nucleo e raggiungono il citoplasma, dove si assemblano formando i ribosomi veri e propri. Il nucleo guida la sintesi proteica sintetizzando l'RNA messaggero (mRNA) in base alle istruzioni contenute nel DNA. Successivamente, l'RNA messaggero viene trasportato nel citoplasma attraverso i pori nucleari e, in questa sede, i ribosomi iniziano a tradurre il messaggio genetico contenuto al suo interno nella struttura primaria di uno specifico polipeptide.

I ribosomi, complessi costituiti da RNA ribosomiale e proteine, rappresentano i componenti cellulari deputati alla sintesi proteica. Questi producono proteine in due diverse zone del citoplasma. In particolare nella cellula si distinguono ribosomi liberi, sospesi nel citosol, e ribosomi legati, che sono associati alla parete esterna del reticolo endoplasmatico o dell'involucro nucleare. La maggior parte delle proteine prodotte dai ribosomi liberi viene utilizzata all'interno della cellula; i ribosomi legati, invece, sintetizzano proteine che vengono rilasciate in ambiente extracellulare (secrezione) o vanno a costituire le membrane cellulari destinate ad avvolgere organelli come i lisosomi [Campbell-Reece 2009].

2. Regolazione epigenetica dell'espressione genica

2.1. Cenni di epigenetica ed espressione genica

A livello cellulare si possono notare modifiche interessanti relative al fenotipo (l'insieme dei geni espressi da una cellula) senza alterazione del genotipo (l'insieme delle sequenze di DNA dei geni di una cellula) guidate dall'influenza dell'ambiente, ma non solo, sulle cellule. Tali concetti si trovano a coesistere in quella che è la definizione di regolazione dell'espressione genica. L'epigenetica studia i meccanismi ereditabili di regolazione dell'espressione genica che determinano il fenotipo cellulare senza intervenire sul genotipo, e che di fatto influenzano l'accessibilità del DNA ai fattori che determinano l'espressione di un gene. In particolare, sperimentalmente, si cerca di agire proprio su questi meccanismi per attuare il silenziamento o l'attivazione di alcuni geni specifici, per intervenire ad esempio in maniera positiva in casi critici come modificazioni delle attività di cellule neoplastiche. Inoltre, un punto di forza di questo tipo di modifiche risulta essere la loro ereditabilità: il fatto di poter tramandare le variazioni dell'assetto epigenetico aumenta l'interesse della ricerca in questo ambito. Tra le modifiche epigenetiche quelle maggiormente studiate sono la metilazione del DNA a livello delle isole CpG (citosina che precede una guanina nella sequenza del DNA) nella regione del promotore di un gene e le modificazioni post-traduzionali delle code delle proteine istoniche. E' su risultati sperimentali relativi a queste ultime, in particolare, che si è articolata l'attività di questa tesi.

2.2. Cenni sulla metilazione del DNA

Nei vertebrati la più rilevante metilazione del DNA studiata in epigenetica interviene sui dinucleotidi CpG, cioè caratterizzati da una citosina che precede una guanina nella sequenza nucleotidica, prevalentemente raggruppati in zone piuttosto compatte, chiamate "isole CpG" nella regione dei promotori di circa il 60% dei geni dell'intero genoma. Di fatto per metilazione del DNA in epigenetica si intende la modifica chimica che porta

all'aggiunta di un gruppo metile $-\text{CH}_3$ al carbonio in posizione 5' di una citosina di un dinucleotide CpG. E' possibile trovare, in ugual presenza, isole CpG isolate anche in regioni non-codificanti o non-espresse del genoma. Quando la metilazione coinvolge l'isola CpG di un promotore, la regione codificante controllata è soggetta a repressione trascrizionale. L'ipermetilazione del promotore è inoltre un processo che risulta associato a molte forme neoplastiche legate al silenziamento di geni con attività oncosoppressiva e si sviluppa nelle primissime fasi della tumorigenesi [PA Jones and SB Baylin Cell 2007].

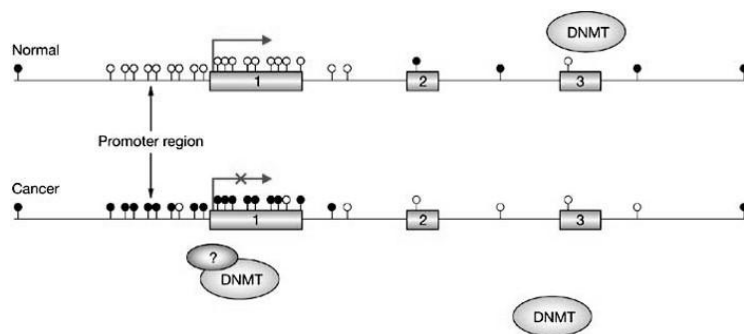


Figura 6: Rappresentazione della metilazione del DNA in cellule normali e neoplastiche. Cerchi bianchi, siti CpG non-metilati; cerchi neri, siti CpG metilati; 1, 2, 3, esoni; X, repressione trascrizionale. *DNMT*, DNA Metiltransferasi [SB Baylin Nat Clin Prac 2005].

Il processo di trasferimento del gruppo metile dal donatore, la S-adenosil-metionina, alla citosina, che è quindi convertita in metil-citosina, è catalizzato dalla classe di enzimi chiamati DNA-metiltransferasi (DNMTs) (Figura 7).

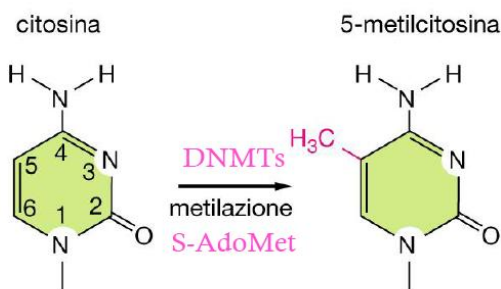


Figura 7; Metilazione della citosina [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

E' quindi intuitivo che parte dell'attenzione sperimentale attuale riguardante l'epigenetica verte sul ricercare strategie per invertire il processo di metilazione dei promotori con lo scopo di "riaccendere" i geni oncosoppressori silenziati nelle neoplasie. Tuttavia è necessario considerare il fenomeno a 360°, in quanto di fatto la metilazione inattiva la trascrizione in associazione con uno stato trascrizionalmente silente della cromatina. La metilazione del DNA sembra essere usata nei vertebrati soprattutto per mantenere stabile nel tempo l'inattivazione di un gene. Sono state proposte diverse ipotesi per spiegare questo legame:

- la metilazione del DNA potrebbe inibire il riconoscimento dei fattori di trascrizione ai loro specifici siti di legame che contengono CpG;
- la metilazione potrebbe avere conseguenze dirette per il posizionamento dei nucleosomi;
- la metilazione recluterebbe fattori specializzati che riconoscono il DNA metilato e impediscono il legame di altri fattori, o reprimerebbe direttamente la trascrizione.[Esteller M et al 2005] .

Il legame tra la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche quindi, risiede nel fatto che lo stato di metilazione della citosina nel promotore è strettamente associata alle modificazioni, acetilazione o metilazioni, post-traduzionali degli istoni. [Bernstein BE et al., 2007].

Nelle cellule dei vertebrati la metilazione del DNA recluta una famiglia di proteine che lega il DNA metilato (MeBPs, methylation binding proteins); queste proteine, a loro volta, interagiscono con complessi che rimodellano la cromatina e altre classi di enzimi come per esempio le istoni deacetilasi (HDAC) che contribuiscono a determinare uno stato conformazionale della cromatina condensato e quindi trascrizionalmente inattivo (Figura 8) [Alberts B et al., 2004].

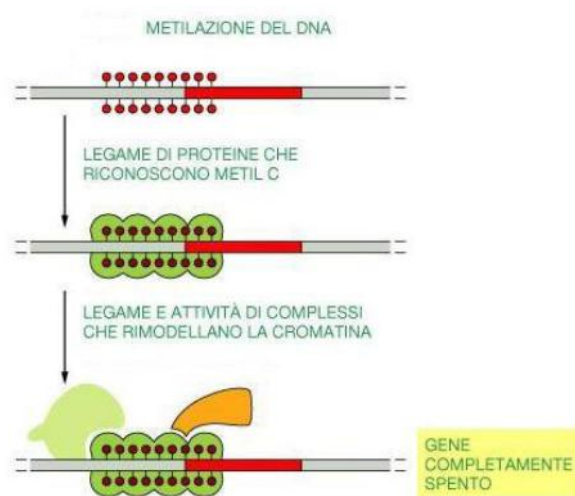


Figura 8: La metilazione del DNA richiama tutta una serie di complessi che portano al silenziamento genico [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

Questo lavoro di tesi si focalizza sulla possibilità di modulare lo stato di aggregazione della cromatina, ponendo l'attenzione sui meccanismi di acetilazione/deacetilazione delle proteine istoniche, attraverso la valutazione di inibitori delle HDAC con potenzialità antitumorali.

2.3. DNA e istoni: un complesso sinergico e polifunzionale

La cromatina è costituita da fibre che contengono DNA che interagisce molto strettamente con proteine chiamate istoni: questi rivestono un ruolo fondamentale nella condensazione del DNA e nella sua organizzazione in unità strutturali detti nucleosomi.

Nella cromatina si trovano anche molte proteine non istoniche, alcune delle quali regolano l'espressione genica.

Gli istoni hanno massa molecolare compresa tra 11 e 21 kDa, sono quindi proteine relativamente piccole; il comune motivo strutturale dei vari tipi di proteine istoniche, noto come ripiegamento istonico, è formato da tre α -eliche connesse da due anse. Ogni proteina istonica ha estremità N-terminale di lunghezza variabile dai 20 ai 60 residui (Figura 9).

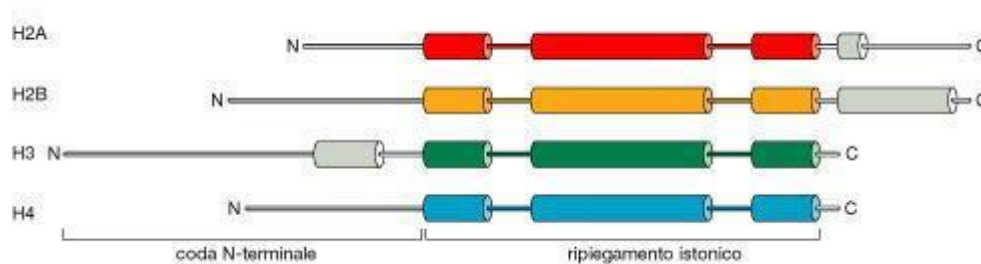


Figura 9: Struttura generale degli istoni [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

Questi polipeptidi sono ricchi degli amminoacidi basici quali l'arginina e la lisina, che nell'insieme, rappresentano circa un quarto dei residui amminoacidici. In tutte le cellule eucariotiche sono presenti cinque classi principali di istoni (H1, H2A, H2B, H3 e H4) aventi massa molecolare e composizione amminoacidica diversa (Tabella 1).

Tabella 1: Tipologie di istoni e loro proprietà fisiche.

Istone	Massa molecolare	Numero di residui amminoacidici	Contenuto di amminoacidi basici (% del totale)	
			Lys	Arg
H1*	21130	223	29,5	11,3
H2A*	13960	129	10,9	19,3
H2B*	13774	125	16,0	16,4
H3	15273	135	19,6	13,3
H4	11236	102	10,8	13,7

*Le dimensioni di questi istoni variano di poco da specie a specie. I numeri qui forniti sono relativi ad istoni bovini.

Gli istoni H3 e H4 hanno una sequenza di amminoacidi pressoché identica in tutti gli eucarioti, il che suggerisce un'elevata conservazione delle loro funzioni. Gli istoni H1, H2A, H2B presentano invece un grado minore di omologia di sequenza tra le diverse specie eucariotiche.

Sottoponendo i cromosomi a trattamenti che li srotolano parzialmente, si evidenzia una struttura nella quale il DNA è legato strettamente a granuli di proteine che presentano una spaziatura regolare. I granuli disposti "a collana" sono complessi di istoni e DNA. Il granulo e il tratto di DNA di connessione con il granulo vicino formano il nucleosoma, l'unità fondamentale dell'organizzazione di base della complessità strutturale di ordine superiore della cromatina (Figura 10).

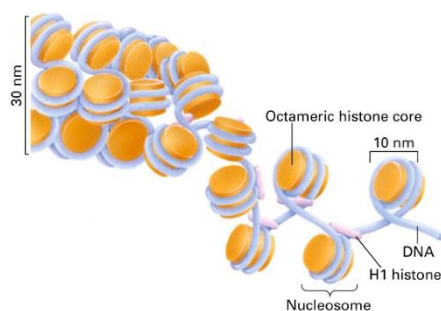


Figura 10: Vari livelli di organizzazione del DNA in nucleosomi [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

Ogni nucleosoma contiene otto proteine istoniche: due copie ciascuno di istoni H2A, H2B, H3 e H4. I nucleosomi costituiscono un'unità ripetitiva formata da circa 200 coppie di basi, 146 dei quali si avvolgono attorno al nucleo istonico, legati con interazioni covalenti quali legame a idrogeno, e le rimanenti servono da DNA di collegamento tra nucleosomi vicini. L'istone H1 funge da spaziatore e collegamento tra i vari nucleosomi e contribuisce al mantenimento dell'organizzazione spaziale della cromatina [Nelson DL and Cox MM, 2011].

Il nucleosoma si forma in fasi successive: i ripiegamenti istonici si legano inizialmente tra di loro, formando dimeri H3-H4 e H2A-H2B, e i dimeri H3-H4 si combinano formando tetrameri. Un tetramero H3-H4 si combina poi con due dimeri H2A-H2B, formando il nucleo compatto dell'ottamero, intorno al quale si avvolge il DNA (Figura 11).

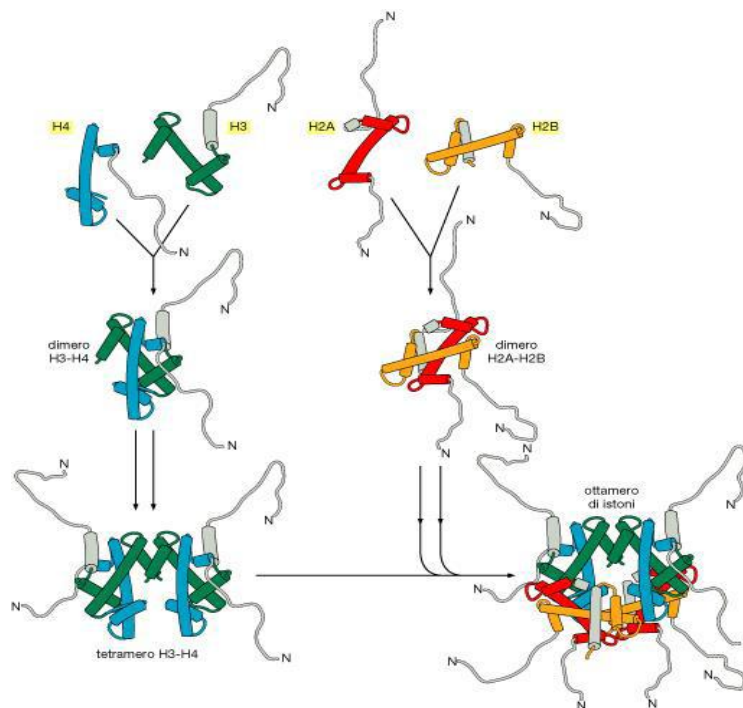


Figura 11: L'assemblaggio di un ottamero di istoni [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

La stretta associazione DNA-istoni è determinata dalle cariche elettriche presenti a livello molecolare: il DNA, infatti, è una struttura carica negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, mentre gli istoni presentano cariche positive dovute ad amminoacidi con catena laterale basica, quali arginina e lisina.

Nei cromosomi isolati con metodiche molto delicate, gli stessi nucleosomi appaiono ulteriormente organizzati in modo da formare una fibra di 30 nm. Con questo grado di avvolgimento, un tipico cromosoma umano avrebbe una lunghezza di 0,1 cm, ben superiore alle dimensioni del nucleo. Chiaramente deve dunque esistere un livello superiore di ripiegamento, anche nei cromosomi interfasicci. Il risultato netto del compattamento è che ciascuna molecola di DNA si può impacchettare in un cromosoma mitotico di lunghezza circa 10 000 volte più corta di quella che avrebbe nella sua forma estesa (Figura 12).

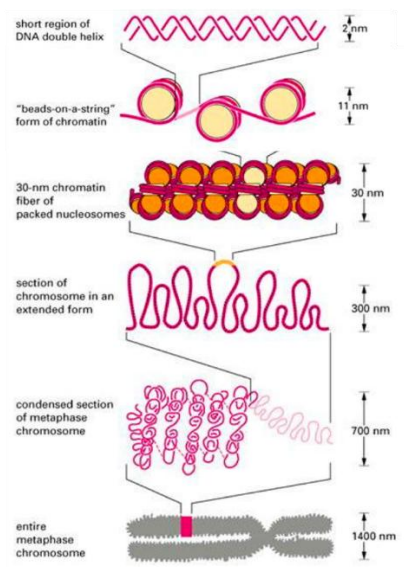


Figura 12: Schematizzazione dell'impacchettamento del DNA sotto forma di cromosomi mitotici [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

La parte strutturale dell'assetto istonico che svolge un ruolo importante nella regolazione epigenetica dell'espressione genica sono le modifiche post-traduzionali delle code N-terminali degli istoni. Queste code istoniche sono soggette a parecchi tipi di modificazioni covalenti associabili a una morfologia della cromatina più compatta o più rilassata; inoltre sono elementi sempre accessibili in quanto si protendono al di fuori della struttura cromatinica in entrambe le configurazioni. L'interesse di questo lavoro di tesi è focalizzato sull'acetilazione istonica come elemento regolatore dell'espressione genica. Per acetilazione istonica si intende il trasferimento di un gruppo acetile a un residuo amminoacidico di lisina presente all'estremità N-terminale degli istoni (Figura 13).

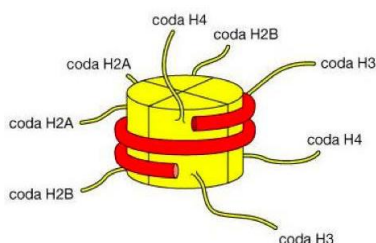


Figura 13: Modello della disposizione delle code istoniche [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

2.4. Modifiche istoniche

La metilazione del DNA, specialmente quella associata al silenziamento di geni oncosoppressori, è il tipo più ampiamente analizzato di alterazione epigenetica dei tumori umani. Tuttavia un altro percorso epigenetico importante di regolazione dell'espressione genica spesso alterato nella carcinogenesi comprende schemi anormali di modificazioni istoniche.

Le proteine istoniche presentano, come accennato in precedenza, una coda ammino-terminale (detta anche N-terminale) i cui residui possono subire diverse modificazioni post-traduzionali come acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione, ognuna associata a un significato funzionale (Figura 14).



Figura 14: Significati funzionali delle modificazioni covalenti delle code istoniche [Figura tratta da: Alberts B et al., 2004].

La conformazione della cromatina, che risulta più o meno accessibile, cambia in relazione al tipo di modifica, e al tipo di residuo della coda istonica alla quale è associata.

L'acetilazione istonica correla con uno stato meno condensato della cromatina, in quanto in questo caso le cariche positive delle code istoniche, che normalmente legano in modo elettrostatico il DNA carico negativamente, sono neutralizzate dall'aggiunta dei gruppi acetile, lasciando quindi il DNA in uno stato più facilmente accessibile e quindi trascrizionalmente attivo. Al contrario la deacetilazione, cioè la rimozione dei gruppi

acetile, correla con una condizione condensata della cromatina e quindi con la repressione trascrizionale. Mentre la correlazione tra l'acetilazione e lo stato di aggregazione della cromatina è univoca, il rapporto con la metilazione è più complesso. È stato osservato che specifici pattern di metilazione istonica sono correlati a un aumento o a un calo di espressione del gene associato. In particolare la metilazione ad esempio della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9me) o della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me) sono associate al silenziamento del locus genico. Al contrario, la metilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me) o della lisina 36 dell'istone H3 (H3K36me) sono marcatori di un gene trascrizionalmente attivo.

L'insieme delle modifiche istoniche, oltre quelle riguardanti la lisina, costituiscono un vero "codice istonico" e interagendo tra loro e con la metilazione del DNA determinano l'epigenoma di una cellula (Figura 15).

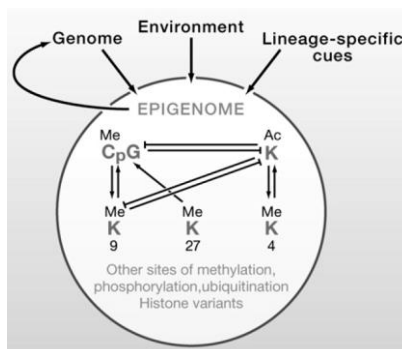


Figura 15: Rappresentazione delle interazioni tra i meccanismi epigenetici che determinano l'epigenoma di una cellula [Figura tratta da: Bernstein BE et al., 2007].

2.5. Processo di acetilazione istonica e rimodellamento della cromatina

La modifica istonica che si andrà a valutare in tale lavoro di tesi è l'acetilazione dei residui di lisina degli istoni H3 e H4. Questa modifica è regolata da due classi di enzimi: le istone acetiltransferasi (HAT), che catalizzano il deposito dei gruppi acetile ai residui di lisina delle code istoniche, e le istone deacetilasi (HDAC) che invece operano la rimozione dei gruppi acetile.

La superfamiglia di proteine HDAC è divisa in 3 classi conosciute: la classe I è simile all'RPD3 dei lieviti, la classe II è simile all'HDAC1 dei lieviti e la classe III è simile alla Sir2 dei lieviti (classe delle sirtuine) e include le deacetilasi NAD⁺-dipendente (Tabella 2). Gli enzimi della classe I (HDACs 1-3, 8, 11) e della classe II (HDACs 4-7, 9, 10) condividono una regione di circa 390 amminoacidi (il cuore della deacetilasi) che contiene il sito catalitico altamente conservato nelle cellule eucariotiche. Enzimi omologhi sono stati trovati anche in batteri e procarioti. Il sito catalitico (attivo) consiste in una “tasca” tubolare con muri idrofobi e un catione Zn²⁺ alla base (Figura 16). Un residuo di lisina acetilata si adatta all'interno della tasca dove Zn²⁺ catalizza l'idrolisi del gruppo acetilico (Figura 17). Gli enzimi di classe I sono localizzati maggiormente nel nucleo, e espressi dai vari tipi di cellule, mentre gli enzimi di classe II si trovano sia nel nucleo sia nel citoplasma e la loro espressione è generalmente dipendente dal tipo di tessuto. Inoltre, alcune HDAC deacetilano oltre agli istoni anche altre proteine non istoniche [Esteller M, 2004].

Class	Enzyme	Catal. domain	Mechanism of deacetylase activity	Subcellular localization	Tissue expression	Inhibitor sensitivity
I (Rpd3-like)	HDAC 1	one	Zn ²⁺ dependent	nuclear	ubiquitous	S
	HDAC 2	one	Zn ²⁺ dependent	nuclear	ubiquitous	S
	HDAC 3	one	Zn ²⁺ dependent	nucleocytoplasmic shuttling	ubiquitous	S
	HDAC 8	one	Zn ²⁺ dependent	nuclear	ubiquitous	S
	HDAC 11	one	Zn ²⁺ dependent	nuclear	ubiquitous	S
II (Hda1-like)	HDAC 4	one	Zn ²⁺ dependent	n. shuttling	tissue specific	S
	HDAC 5	one	Zn ²⁺ dependent	n. shuttling	tissue specific	S
	HDAC 6	two	Zn ²⁺ dependent	n. shuttling	tissue specific	S
	HDAC 7	one	Zn ²⁺ dependent	n. shuttling	tissue specific	S
	HDAC 9	one	Zn ²⁺ dependent	n. shuttling	tissue specific	S
	HDAC 10	one	Zn ²⁺ dependent	n. shuttling	tissue specific	S
III (Sir2-like)	SIRT 1	one	NAD ⁺ dependent	nucleus	NU	NS
	SIRT 2	one	NAD ⁺ dependent	cytosol	NU	NS
	SIRT 3	one	NAD ⁺ dependent	mitochondria	NU	NU
	SIRT 4	one	NAD ⁺ dependent	NU	NU	NU
	SIRT 5	one	NAD ⁺ dependent	NU	NU	NU
	SIRT 6	one	NAD ⁺ dependent	NU	NU	NU
	SIRT 7	one	NAD ⁺ dependent	NU	NU	NU

Tabella 2: Classificazione delle istone deacetilasi nei mammiferi (HDACs) [Mai 2005].

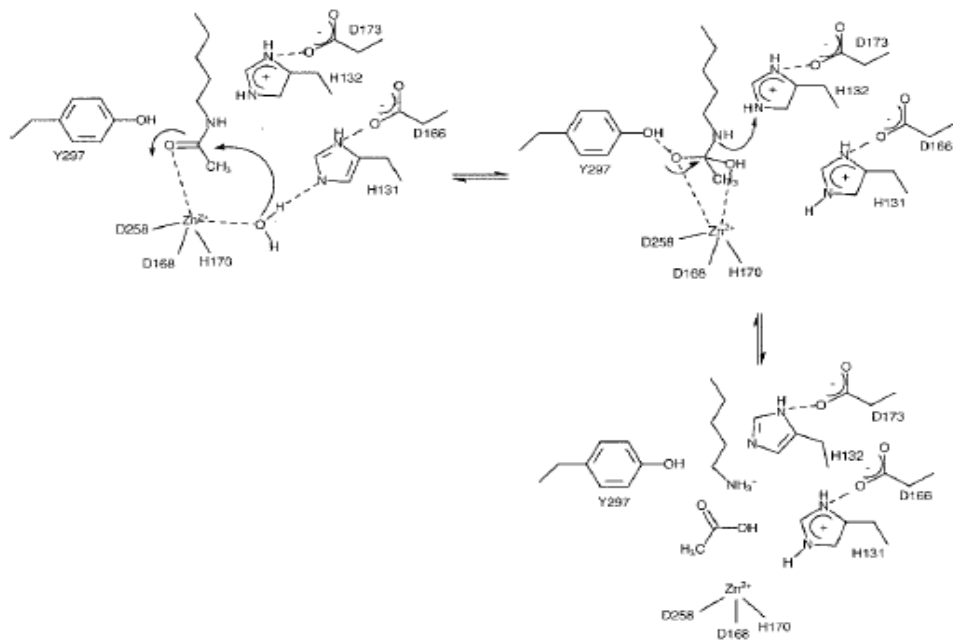


Figura 16: Meccanismo proposto per la deacetilazione mediata dalle HDAC [Mai 2005].

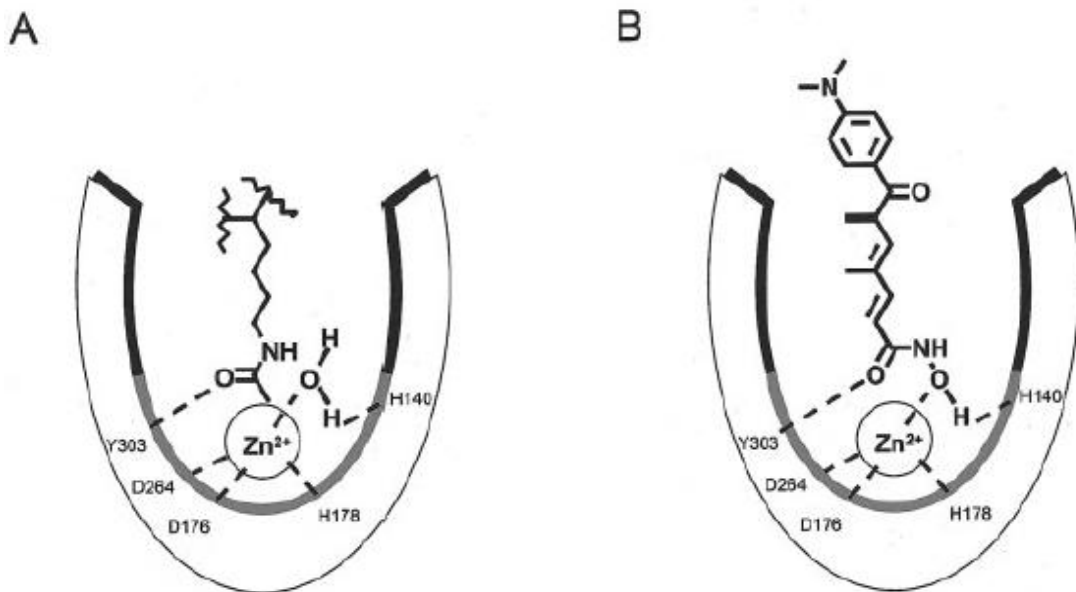


Figura 17: Diagramma del sito catalitico di HDAC1, basato sui dati di Finnin et al.: (a) interazione di un residuo di acetil-lisina e una molecola di acqua con il catione di zinco; (b) Tricostatina A (TSA, inibitore delle HDAC) chelante dello Zn^{2+} . Si suppone che l'acido idrossamico si adatti all'interno della tasca catalitica e leghi lo zinco allo stesso modo. Le linee nere spesse rappresentano le superfici idrofobe. Le linee spesse grigie indicano aree ricche di amminoacidi carichi (specialmente acido aspartico e istidina) [Esteller 2004].

La presenza delle lisine acetilate nelle code istoniche associa a uno stato meno condensato della cromatina (eucromatina) e quindi a uno stato trascrizionalmente attivo, mentre i residui deacetilati sono associati all'eterocromatina e quindi a uno stato di silenziamento trascrizionale.

Il silenziamento epigenetico di un gene è spesso associato a densa ipermetilazione delle isole CpG collocate nella regione del promotore, seguita dal reclutamento dei complessi MBD (Methyl-CpG-binding domain) e delle HDAC che deacetilano le code istoniche determinando uno stato conformazionale della cromatina compatto e inaccessibile ai complessi trascrizionali [Esteller 2004]. Differentemente l'attivazione di un gene è tendenzialmente correlata con CpG demetilate in associazione a code istoniche acetilate (Figura 18 e 19).

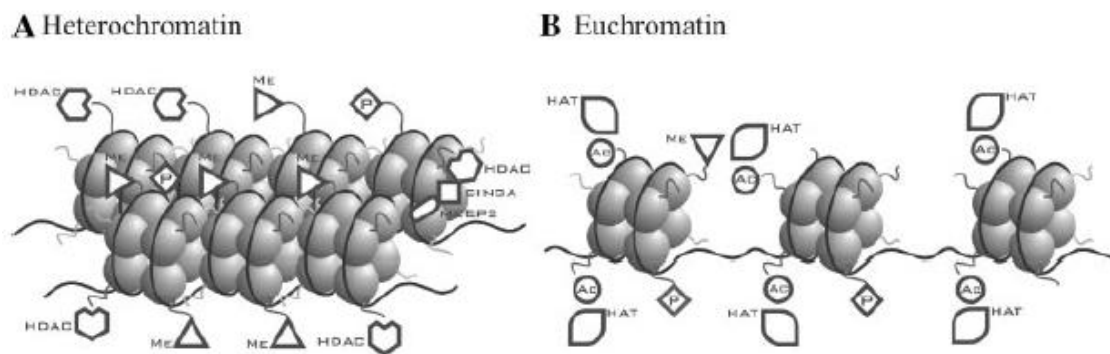


Figura 18: La struttura della cromatina regola l'attività trascrizionale. **A:** la metilazione del DNA e la deacetilazione istonica inducono uno stato compatto della cromatina trascrizionalmente represso. **B:** l'acetilazione istonica e la demetilazione del DNA determinano un rilassamento della cromatina e quindi attivazione trascrizionale [Mai 2005].

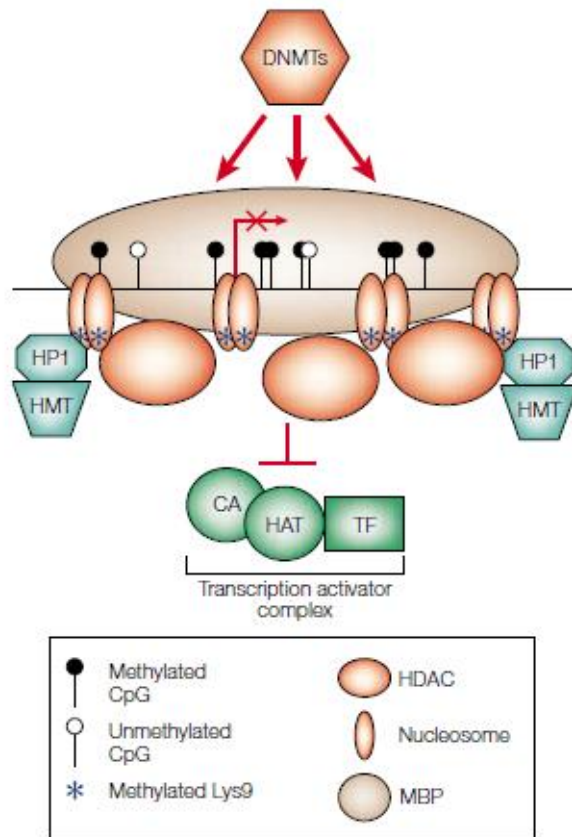


Figura 19: Tipica conformazione della cromatina del DNA trascrizionalmente “spento”.

Nell’eterocromatina, la maggior parte delle isole CpG candidate sono metilate ad opera delle DNMTs e legate dalle MBPs che reclutano le HDACs. Gli istoni sono quindi deacetilati e organizzati in nucleosomi strettamente compatti. I complessi di attivazione trascrizionale, che comprendono i fattori di trascrizione (TF), le proteine coattivatrici (CA) e proteine con attività acetiltransferasica (HAT), sono esclusi [Baylin 2002].

Il silenziamento genico può avvenire anche in assenza di ipermetilazione del promotore, quando la cromatina si trova in una conformazione compatta e quindi trascrizionalmente repressa a causa dell’ipoacetilazione degli istoni, causato dal reclutamento delle HDACs. L’archetipico gene silenziato in questa maniera nei tumori umani è il gene oncosoppressore inibitore della chinasi ciclina-dipendente $p21^{WAF1}$. La riattivazione epigenetica di $p21^{WAF1}$ tramite gli inibitori delle HDACs (HDACi) è stata rilevata nelle cellule tumorali e il ripristino dell’espressione del gene $p21^{WAF1}$ tramite gli HDACi è associata a un arricchimento di istoni iperacetilati nella regione del promotore del gene in questione. Gli inibitori delle HDAC potrebbero svolgere un ruolo rilevante con effetto antitumorale

mediando la riattivazione dei geni regolati da questo tipo di silenziamento genico che non coinvolge mutazioni o alterazione della metilazione del DNA [Esteller 2004] (Figura 20).

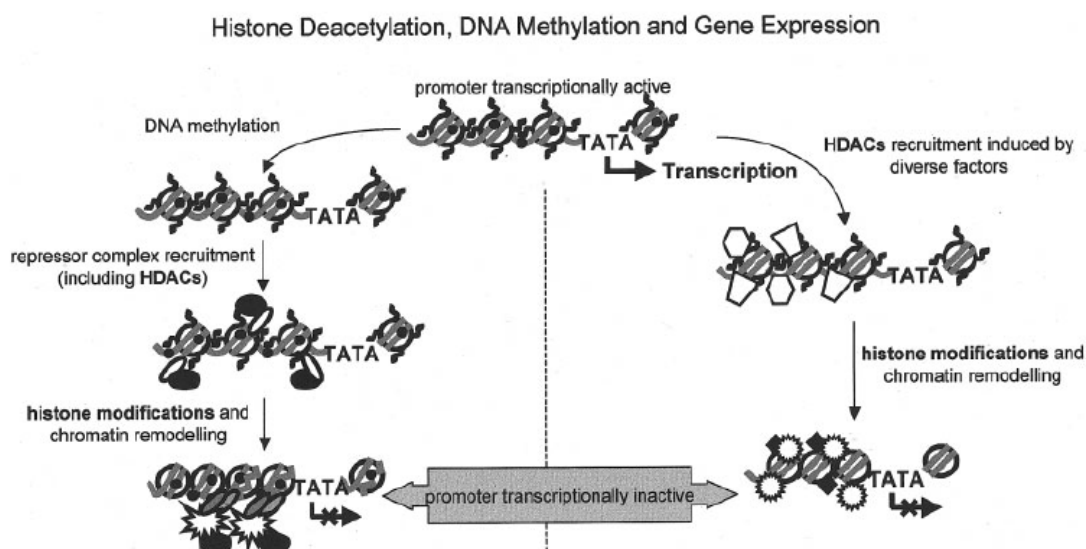


Figura 20: Modello di inattivazione trascrizionale epigenetica di geni oncosoppressori nel cancro umano: a sinistra, il silenziamento del promotore è associato alla metilazione in cooperazione con la deacetilazione istonica; a destra, il silenziamento del promotore è invece associato alla deacetilazione in assenza dell'ipermetilazione del DNA [Esteller 2004].

2.6. Inibitori delle HDAC nella terapia antitumorale

Uno dei meccanismi epigenetici disregolati nel cancro sul quale intervenire con lo scopo di riattivare geni oncosoppressori silenziati o indurre morte cellulare è rappresentato dall'inibizione delle HDAC. Questo lavoro di tesi si inserisce in questo contesto con lo scopo di valutare farmaci con attività inibitoria delle HDAC per i loro effetti e la loro selettività verso cellule neoplastiche.

Esiste una vasta gamma di inibitori delle HDAC (HDACi), naturali o sintetici, sviluppati negli anni anche grazie all'interesse da parte delle case farmaceutiche per il grande potenziale che queste molecole hanno come agenti antitumorali o nel trattamento di altre patologie umane.

La struttura biochimica degli inibitori HDAC è estremamente eterogenea, da composti semplici a strutture più elaborate. Questi composti possono essere classificati in accordo

alla loro natura chimica e al loro meccanismo di inibizione. Si annoverano i composti derivati dall'acido idrossamico [es. Tricostatina A (TSA), SAHA (Vorinostat)], gli acidi carbossilici (es. acido valproico), i derivati benzamidici [es. MS-275 (Entinostat)], gli epossidi [es. trapoxina (TPX)], i peptidi ciclici (es. romidepsin) e altri (Figura 21).

I derivati degli acidi idrossamici costituiscono la più ampia serie di HDACi, e mostrano capacità inibitoria verso la classe I e II delle HDAC. La struttura generale di queste sostanze consiste in un linker idrofobico che permette al gruppo idrossamico di chelare il catione nella parte più interna della tasca catalitica dell'HDAC, mentre il resto della molecola blocca l'accesso alla tasca (Figura 21).

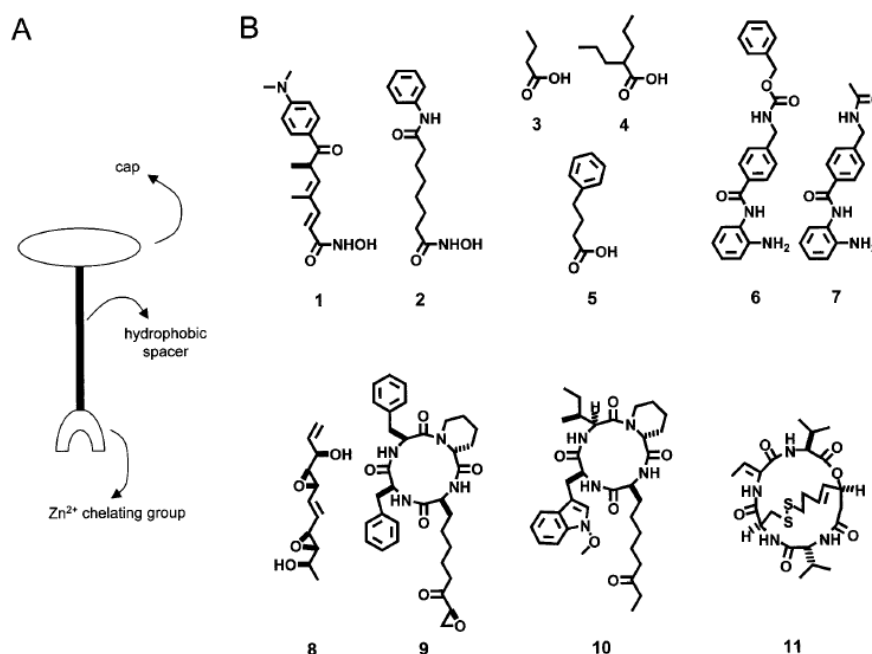


Figura 21: Composti con provata attività inibitoria delle HDAC. (a) Schema che mostra la struttura generale di queste sostanze. (b) Esempi di sostanze chimiche che includono differenti gruppi inibitori delle HDAC: TSA (1) e SAHA (2) sono acidi idrossamici; l'acido butanoico (3), l'acido valproico (4) e l'acido 4-fenilbutanoico (5) sono acidi carbossilici; MS-275 (6) e N-acetildinalina (7) sono benzammidi; depeudecin (8) e trapoxin A (9) sono epossidi; altri mostrati sono l'apicidin (10) e il depsipeptide FK228 (11).

La maggior parte degli acidi idrossamici sono molto efficaci nell'inibizione reversibile delle classi I/II delle HDAC, infatti *in vitro* vengono utilizzati con concentrazioni da nanomolare a micromolare. Tra questi composti troviamo la TSA, che è stato uno dei primi inibitori delle HDACs descritti ed è ampiamente usato nelle ricerche come termine di

confronto della capacità inibitoria di altri composti. Tuttavia la sua tossicità per i pazienti e la mancata specificità per le singole isoforme delle HDAC ha spinto la ricerca a studiare e sintetizzare altre molecole. Il design di diversi farmaci sintetici è stato spesso ispirato dalla struttura della TSA (il “tappo” aromatico, la funzionalità dell’acido idrossamico e il linker idrofobico): dai più semplici SAHA e Scriptaid (utilizzato in questo lavoro di tesi come controllo positivo dell’inibizione delle HDAC), ai farmaci di nuova generazione.

Gli HDACi hanno evidenziato rilevanti effetti antitumorali associati alla riattivazione dell’espressione di geni oncosoppressori. Tuttavia diversi altri fattori possono svolgere un ruolo importante: risultati sperimentali del trattamento di linee cellulari tumorali con HDACi hanno evidenziato effetti pleiotropici, inclusi differenziamento, arresto del ciclo cellulare e apoptosi [Cheong JW, Chong SY, Kim JY et al. 2003].

Il trattamento con HDACi induce iperacetilazione istonica diffusa associata a uno stato attivo della cromatina attivo. Ci si potrebbe aspettare sovraespressione della maggior parte dei geni, tuttavia diversi studi sperimentali su linee cellulari hanno rivelato che il numero significativo di geni inibiti è simile al numero di quelli sovraespressi [Glaser KB, Staver MJ, Waring JF et al. 2003]. Questo emerge perché la trascrizione e la struttura della cromatina sono strettamente controllate anche da meccanismi diversi dall’acetilazione istonica, che includono altre modificazioni istoniche, ligandi complessi e proteine; inoltre l’acetilazione di certi residui potrebbe non essere necessariamente correlata all’attivazione della trascrizione.

La dinamica di azione degli inibitori delle HDAC è molto veloce: queste molecole sono efficaci entro le prime 24 ore di somministrazione del farmaco nelle cellule in coltura. Questo è uno dei motivi per il quale la durata dei trattamenti effettuati in laboratorio in questo lavoro di tesi non supera le 24 ore. Gli effetti degli HDACi sono reversibili e possono essere annullati semplicemente mantenendo le colture cellulari in un terreno privo di farmaci.

Nonostante gli HDACi agiscano mediante meccanismi simili (es. bloccando l’accesso ai residui dell’acetil-lisina alla tasca catalitica delle HDACs), queste sostanze producono diversi pattern di espressione genica e diversi effetti sulla crescita cellulare in relazione alla specifica linea cellulare trattata. Questo comportamento potrebbe essere dovuto alla non specificità del farmaco o alla differente affinità per le varie isoforme di HDAC. Inoltre i

meccanismi di induzione di apoptosi possono essere svariati e specifici per ogni linea cellulare e per ogni farmaco utilizzato.

Gli HDACi possono anche sensibilizzare le cellule neoplastiche alla chemioterapia, determinando una maggiore efficacia in terapia combinatoria nel trattamento tumorale, o essere utilizzati in sinergia con gli agenti demetilanti per la riattivazione di geni oncosoppressori epigeneticamente silenziati. In generale una terapia combinata ha due vantaggi: in primo luogo, la dose necessaria di ogni farmaco per determinare un effetto è sensibilmente ridotta rispetto al suo utilizzo come agente singolo, limitando perciò gli effetti collaterali associati; in secondo luogo, una strategia terapeutica multiagente può aiutare a vincere la resistenza delle cellule cancerose ai chemioterapici tradizionali [Esteller 2004].

3. Poliammine e cancro

3.1. Cenni teorici sulle poliammine

Le poliammine sono composti organici aventi due o più gruppi amminici: le più comuni sono putrescina, spermidina e spermina (Figura 22). Il loro ruolo è molteplice ma non ancora chiaramente definito: sicuramente sono coinvolte nella regolazione della proliferazione cellulare [Jänne J et al., 2004]. Le poliammine a pH fisiologico sono policationi: questa caratteristica conferisce loro grande affinità per le molecole polianioniche di DNA. Questa interazione si basa soprattutto sulle interazioni elettrostatiche tra la carica positiva dei gruppi amminici delle poliammine e la carica negativa dei gruppi fosfato dello scheletro degli acidi nucleici.

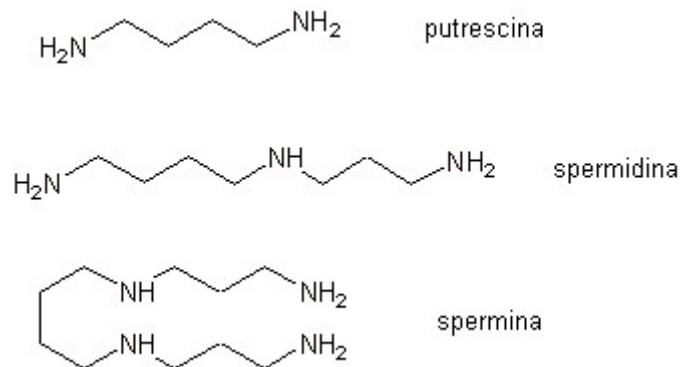


Figura 22: Poliammine naturali: putrescina, spermidina e spermina.

3.2. Il ruolo delle poliammine nella cellula: il fulcro di un nuovo approccio alle terapie antitumorali

E' noto che le poliammine rivestono ruoli decisamente diversi nel contesto cellulare: partecipano al mantenimento della struttura del DNA, all'elaborazione dell'RNA e al processo di codifica proteica. In particolare le poliammine intervengono nella regolazione dell'espressione genica: esistono evidenze sperimentali, a volte contraddittorie, del coinvolgimento delle poliammine nella modulazione epigenetica dell'assetto cromatinico. Sono presenti infatti dati che inducono ad attribuire alle poliammine sia un ruolo di induttori dell'espressione genica sia di repressori. L'eterogeneità dei risultati pubblicati probabilmente dipende dai settaggi sperimentali e dai diversi approcci metodologici utilizzati dai vari autori [Pasini A et al., 2013]. Il coinvolgimento delle poliammine nella regolazione dell'espressione genica, come modulatrici dirette dello stato di accessibilità della cromatina o indirette attraverso l'interazione con gli enzimi che modificano l'assetto trascrizionale della cromatina, conferisce a queste piccole molecole particolare interesse nel contesto delle neoplasie, dove i meccanismi epigenetici sono altresì altamente disregolati.

Parallelamente a un alterato assetto epigenetico, infatti il tessuto canceroso mostra anche elevati livelli di poliammine, come evidenziato dalla loro alta concentrazione nei fluidi corporei di pazienti affetti da cancro. L'accumulo delle poliammine può essere

conseguente a un aumento dell'espressione e/o dell'attività degli enzimi che le sintetizzano, come l'ornitina decarbossilasi (ODC) o dei trasportatori di membrana che ne favoriscono l'uptake dall'ambiente extracellulare. Farmaci che inibiscono la sintesi delle poliammine, come l' α -difluorometilornitina (DFMO), sono stati studiati con scopi terapeutici in oncologia [Hobbs CA et al., 2003].

Esistono anche molecole derivate delle poliammine che possono essere utilizzate come modulatori epigenetici con enorme potenziale nella terapia antitumorale [Senanayake 2009]. Queste molecole farmacologicamente attive e basate, appunto, sulle poliammine sono elementi promettenti sia da utilizzare in maniera indipendente, sia in combinazione con altri agenti antitumorali.

3.3. Poliammine come inibitori delle HDACs

Come più volte riportato nel presente testo, l'acetilazione reversibile degli istoni, mediata dalle istone acetiltransferasi (HATs) e dalle istone deacetilasi (HDACs), svolge un ruolo critico nell'architettura della cromatina e, perciò, nell'espressione genica. L'acetilazione della lisina nelle code cationiche degli istoni ne neutralizza la carica e promuove il rilassamento della cromatina, portando a un'attivazione trascrizionale. Al contrario, la deacetilazione della lisina promuove la formazione di una cromatina condensata associata a repressione trascrizionale. In alcune cellule tumorali si è rilevato che l'ipoacetilazione degli istoni sia associata ai promotori dei geni regolatori della crescita cellulare, come l'inibitore chinasi ciclina-dipendente $p21^{Waf1}$: la conseguente sottoespressione del gene è quindi considerata concorrente allo sviluppo del cancro e al suo mantenimento. L'iperacetilazione istonica causata dagli inibitori delle HDAC come TSA, **1**), MS-275 (**2**) e SAHA (**3**) (Figura 23) può causare l'arresto della crescita delle cellule e inibire quindi la proliferazione e la crescita neoplastica. Gli analoghi **1-3** si diversificano per le modificazioni dell'anello aromatico e della regione di collegamento alifatica. Nonostante siano efficaci nell'inibizione della deacetilazione istonica sia *in vivo* sia *in vitro*, questi composti soffrono di una mancata specificità per le varie isoforme delle HDAC. Inoltre i composti **1** e **2** mostrano effetti collaterali nelle cellule sane. Perciò sarebbe desiderabile

identificare nuovi efficaci inibitori delle HDAC che ripristinino l'espressione dei geni oncosoppressori limitando gli effetti tossici e le dosi di farmaco da somministrare.

Per risolvere questo problema sono stati progettati e sintetizzati una serie di derivati dell'acido poliamminoidrossamico (PAHA) che incorpora le strutture caratteristiche delle poliammine spermina e spermidina (**4** e **5** rispettivamente in Figura 23) e la parte di acido idrossamico comune agli inibitori della HDAC **1** e **3** [Varghese et al. 2005].

Di fatto, questi derivati poliamminici fanno parte di una più ampia categoria di composti che presentano uno scheletro chimico comune: la loro struttura comprende una sorta di "cappuccio" costituito da un gruppo aromatico, una catena di collegamento alifatica con un gruppo funzionale in grado di formare legami con i metalli e una catena poliamminica laterale (Figura 24) [Senanayake et al. 2009].

Questa strategia è stata sviluppata basandosi sul fatto che gli analoghi delle poliammine possono esercitare effetti antitumorali più efficaci in virtù della loro alta affinità per la molecola di DNA; inoltre, tali composti, sono in grado di sfruttare il sistema di trasporto delle poliammine che si trova spesso sovrappreso a livello delle membrane delle cellule tumorali [Palmer and Wallace 2010]. Di fatto la sovraespressione di tali sistemi di trasporto rappresenta un marcatore delle cellule neoplastiche. I composti derivanti dalle poliammine con attività inibitoria delle HDAC hanno anche potenzialità di sviluppo con lo scopo di ottenere HDACi specifici per le singole isoforme HDACs alterando la composizione della catena poliamminica, sfruttando le differenze proprie delle HDAC nella loro sequenza nei residui specifici nella regione dell'anello fuori del sito legante la lisina [Varghese et al. 2005].

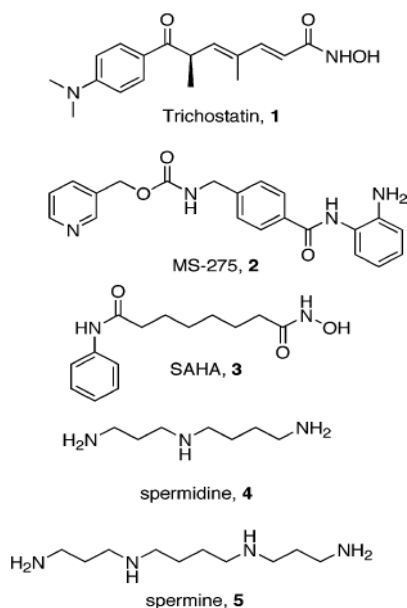


Figura 23: Strutture di tricostatina, MS-275, SAHA, spermidina e spermina [Varghese S et al 2005].

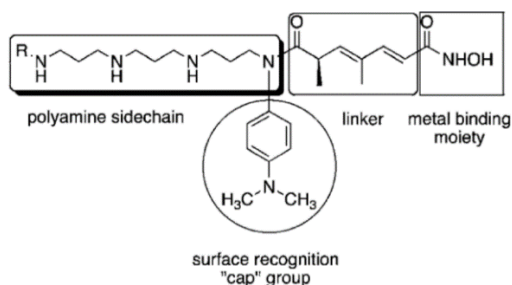


Figura 24: Struttura generale degli inibitori delle HDAC basati sulle poliammine [Senanayake et al. 2009].

Quando si valutano sperimentalmente gli effetti di queste molecole derivanti dalle poliammine con capacità inibitoria delle HDAC spesso si utilizza il DFMO, inibitore della sintesi delle poliammine. Il DFMO si lega al sito attivo dell'ODC e viene decarbossilato, ma rimane legato covalentemente all'enzima inducendone una perdita di attività permanente [Poulin et al. 1992]. Inibendo, quindi, il metabolismo delle poliammine all'interno della cellula mediante il trattamento con DFMO si determina un aumento dell'assorbimento delle poliammine esogene (presenti nella matrice extracellulare e somministrate mediante trattamento farmacologico) attraverso il loro sistema di trasporto. La combinazione dei derivati poliamminici e del DFMO è risultato efficace nel

determinare una sinergica riespressione di geni oncosoppressori silenziati in maniera anomala, come il gene *SFRP2*, che svolge un ruolo antitumorale importante nel tumore nel cancro colon rettale [Wu et al. 2012].

4. Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi consiste nel valutare l'efficacia di inibizione delle HDAC e la selettività per le cellule tumorali di nuove molecole basate su coniugati poliamminici (PC1, PC2, PC3, PC4, PC5). I modelli sperimentali utilizzati saranno una linea cellulare tumorale di glioblastoma umano (U87), paragonata a una linea cellulare sana di fibroblasti fetali umani (IMR90).

Il progetto nasce dalla collaborazione con la Prof.ssa Anna Minarini del Dipartimento di Farmacia e BioTecnologie di Bologna e con il Dott. Andrea Milelli del Dipartimento di Scienze per la Qualità della Vita di Rimini che hanno progettato e sintetizzato i composti poliamminici utilizzati negli esperimenti condotti nel laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "S. Cavalcanti" a Cesena.

Gli obiettivi del progetto consistono nel valutare i potenziali vantaggi che sembrano offrire le poliammine se coniugate a molecole con specifiche funzioni antitumorali, quali l'acido idrossamico e il gruppo intercalante il DNA, naftalene-diimide. L'aggiunta della coda poliamminica al composto, infatti, permetterebbe alla molecola risultante di sfruttare il sistema di trasporto delle poliammine, tipicamente sovraespresso o iperattivo nelle cellule neoplastiche, favorendo così l'ingresso in cellula del farmaco e conferendogli selettività per le cellule tumorali. Inoltre, l'affinità elettrostatica che intercorre tra la coda policationica poliamminica e il DNA, carico negativamente, direzionerebbe con maggior efficacia l'intera molecola, compresa la parte intercalante e l'acido idrossamico (HDACi), verso il loro bersaglio, la doppia elica dell'acido nucleico e le HDAC.

Gli effetti dei PC valutati in questo lavoro di tesi comprendono l'influenza dei farmaci sulla vitalità cellulare e l'efficacia di inibizione delle HDAC. Si effettueranno test di

crescita cellulare in seguito ai trattamenti farmacologici per confrontare i diversi composti poliamminici, individuare quelli con maggior effetto citotossico e stabilire se il tipo di trattamento risulti idoneo per il proseguimento dell'indagine. Il grado di inibizione delle HDAC, relativo ai diversi farmaci, verrà valutato indirettamente mediante la tecnica del Western Blotting quantificando il livello di iperacetilazione istonica globale indotta.

I vantaggi che queste nuove molecole potenzialmente possiedono e che andranno verificati con ulteriori studi, inducono ad attribuire loro un grande potenziale per la terapia antitumorale, come induttori dell'apoptosi e/o riprogrammazione dell'assetto epigenetico, risultante nella riattivazione di geni oncosoppressori silenziati nelle cellule neoplastiche. L'azione antitumorale di queste molecole potrà essere più efficace se combinata con altri farmaci, quali chemioterapici standard o demetilanti del DNA. Inoltre la variazione della coda poliamminica potrà essere utile per lo sviluppo di inibitori specifici per le diverse isoforme delle HDAC. La selettività per le cellule tumorali e l'affinità per il DNA di questi nuovi composti potrebbe infine limitare gli eventuali effetti collaterali in clinica.

MATERIALI E METODI

5. Coltura cellulare

Gli esperimenti biologici si possono condurre sia su organismi interi, che su tessuti o organi. Lavorando su tessuti e organi gli esperimenti in genere sono a breve termine, poiché è necessario mantenere il tessuto il più possibile in uno stato simile a quello fisiologico.

Le colture cellulari con opportune condizioni sperimentali durano più a lungo e permettono una varietà di studi non sostenibili con i tessuti ^[1].

Poiché all'interno dell'organismo esistono specifici sistemi di controllo che regolano funzioni vitali come nutrizione, protezione, mantenimento della temperatura e del pH; la coltivazione di cellule *in vitro* deve essere condotta mantenendo le stesse condizioni fisico-chimiche. Per questo motivo sono fondamentali le funzioni svolte dal terreno di coltura e dagli strumenti usati per la manipolazione delle cellule in laboratorio.

I terreni di coltura per cellule animali contengono numerosi elementi: sali inorganici, che assicurano cationi e anioni come Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , indispensabili per la funzione cellulare, glucosio per le funzioni metaboliche legate al fabbisogno energetico, amminoacidi essenziali indispensabili per la sintesi proteica, vitamine coadiuvanti innumerevoli funzioni cellulari e siero che è una fonte di proteine e fattori di crescita in genere indispensabili per la proliferazione.

Il pH del terreno di coltura è tamponato circa a 7.4 aggiungendo generalmente bicarbonato/acido carbonico. La presenza di un indicatore come il rosso fenolo consente di monitorare il pH del terreno di coltura; il colore giallastro indica infatti un valore di pH acido mentre il rosso-violaceo corrisponde ad un pH basico ^[2].

Le tipiche condizioni di coltura cellulare sono garantite mantenendo le cellule in appropriati mezzi di coltura liquidi (terreni di coltura) all'interno di contenitori di plastica

opportunamente trattata (fiasche e piastre da coltura) e conservandole nel tempo in incubatori che sono in grado di mantenere controllata la temperatura, la pressione parziale dell'anidride carbonica e l'umidità.

Un ulteriore problema da non sottovalutare è la sterilità: i mezzi di coltura sono infatti molto "appetibili" per batteri, lieviti e funghi che possono facilmente inquinare le colture cellulari. Questo problema viene affrontato a vari livelli. Tutte le manipolazioni delle colture cellulari vengono fatte in cappe a flusso laminare provviste di filtri HEPA, 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. Infine, vengono spesso aggiunti antibiotici ai terreni di coltura, sterilizzati per filtrazione (con filtri da 0,22 μm), per limitare la possibilità di inquinamento da parte dei più comuni batteri ^[3].

Esistono differenti tipi di coltura cellulare. Quelle provenienti direttamente dal tessuto, da embrioni, da cellule adulte in sospensione o da tumori vengono definite colture primarie. In genere contengono una miscela relativamente eterogenea di cellule in differenti stati fisiologici, che cresceranno o in sospensione o adese ad una matrice artificiale, come la plastica o il collagene (base delle piastre da coltura).

Le subcoltivazioni di colture primarie, originate da cellule che raggiungono la confluenza, ovvero ricoprono l'intera matrice a cui esse sono adese, vengono definite colture secondarie ^[4]. Nella maggior parte dei casi le cellule derivate dalla dissociazione di tessuti hanno una limitata capacità replicativa e tendono a diventare "senescenti". Vi sono, tuttavia, "linee cellulari" che sono in grado di replicarsi indefinitamente in coltura e che vengono spesso usate come modelli sperimentali. Le cellule di tali linee sono spesso derivate da colture primarie di tumori o da manipolazioni genetiche di colture primarie non tumorali. Tali manipolazioni, collettivamente chiamate "immortalizzazione", prevedono l'inserimento di specifici geni virali o anche la selezione di subpopolazioni proliferanti per molti passaggi di una coltura primaria.

Le linee cellulari non sfruttate per gli esperimenti sono mantenute, per tempo indefinito, ibernare a bassa temperatura (al di sotto di -60°C , ma tipicamente a -192°C , in azoto liquido) ^[5].

Una volta preparate, le colture cellulari vengono mantenute cambiando il terreno due o tre volte a settimana. Quando la superficie di crescita non risulta più sufficiente alla sistemazione di nuove cellule figlie la coltura si definisce confluenta. A causa dell'inibizione da contatto, in una coltura confluenta, le moltiplicazioni cessano e si ha quindi un rallentamento del metabolismo, con conseguente accumulo di prodotti tossici ^[1]. In generale, per permettere alle cellule di continuare a crescere ed evitare la sovraconfluenza in piastra, è necessario procedere a periodici trapianti in terreni freschi. A tale scopo si utilizza un procedimento indicato come tripsinizzazione, che consente di staccare le cellule dal substrato al quale sono adese, risospenderle e, quindi, trapiantarle in mezzo fresco, ricco di tutti quei componenti necessari alle loro attività metaboliche (vitamine, sali inorganici, proteine e costituenti sierici). Il distacco delle cellule dal substrato d'adesione è ottenuto con l'impiego di un particolare enzima proteolitico, la tripsina, che digerisce il materiale glicoproteico presente sulla membrana cellulare, responsabile dell'adesione, senza distruggere o uccidere le cellule. Aliquote di sospensione cellulare così ottenute vengono utilizzate per iniziare una coltura secondaria (o passaggio) ^[1].

Le colture cellulari vengono utilizzate nella ricerca come modello sperimentale con innumerevoli scopi come per esempio, l'analisi dell'espressione genica, la valutazione dell'effetto di farmaci e la verifica della mutagenicità e cancerogenicità di nuovi composti, attività condotte anche in questo lavoro di tesi.

5.1. Glia e linea cellulare U87 di glioblastoma umano

Il sistema nervoso è costituito principalmente da due tipi di cellule: i neuroni, ovvero le unità essenziali per lo scambio di segnali con il sistema nervoso, e cellule di supporto chiamate cellule gliali, che costituiscono la glia o neuroglia. Le cellule gliali sono molto più numerose rispetto i neuroni: in rapporto 10-50:1.

Come accennato, sebbene non partecipino attivamente alla trasmissione del segnale elettrico sulle lunghe distanze, comunicano con i neuroni e forniscono loro un importante supporto biochimico.

Il sistema nervoso si può suddividere in due sottosistemi: sistema nervoso periferico e sistema nervoso centrale. Il primo presenta due tipi di cellule gliali: cellule di Schwann e cellule satellite; il secondo, invece, ne presenta quattro: oligodendrociti, microglia, astrociti e cellule ependimali.

I glioblastomi (GBM) sono tumori che colpiscono gli astrociti. Questi tumori sono, in generale, maligni perché le cellule si riproducono rapidamente e sono supportati da una grande rete di vasi sanguigni. Esistono due tipi di glioblastomi:

- Primari: questi tumori tendono a formarsi e manifestarsi molto velocemente. Essi costituiscono la forma più comune di glioblastoma e presentano un alto grado di aggressività.
- Secondari: questi tumori hanno una storia di crescita più lenta, pur essendo molto aggressivi. Essi all'origine sono spesso tumori di grado inferiore che progrediscono in forme neoplastiche di grado superiore.

Il glioblastoma rappresenta circa il 17% di tutti i tumori primari del cervello e circa il 60-75% di tutti gli astrocitomi. La frequenza di tale tumore aumenta con l'età colpendo più uomini che donne. Solo il 3% dei tumori cerebrali infantili sono glioblastomi. Come per molti altri tumori, rimangono ignote le cause specifiche di questo tumore.

Tale neoplasia può essere difficile da trattare perché è costituita da cellule eterogenee. Alcune di queste possono rispondere bene a certe terapie, mentre altre potrebbero essere resistenti. Questo è il motivo per cui il piano di trattamento per il glioblastoma può combinare diversi approcci. Quelli più utilizzati sono le radiazioni e la chemioterapia che possono essere usati per rallentare la crescita dei tumori che non possono essere rimossi con la chirurgia.

In tale lavoro di tesi viene utilizzata la linea di glioblastoma umano U87 (Figura 25) con lo scopo di verificare l'entità degli effetti di farmaci poliamminici. Essi, infatti, possono indurre iperacetilazione istonica: meccanismo epigenetico testato come nuovo approccio alla terapia antitumorale ^[6].

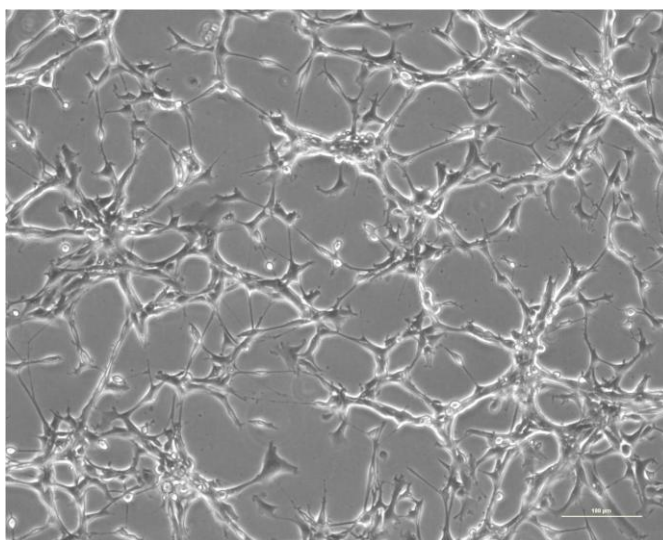


Figura 25: Linea di glioblastoma umano U87.

5.2. Tessuto connettivo e linea cellulare IMR90

I tessuti connettivi sono in grado di fornire supporto strutturale e una barriera fisica che, in cooperazione con cellule specializzate, aiuta a difendere il corpo da invasori esterni come batteri. La caratteristica distintiva dei tessuti connettivi è la matrice extracellulare contenente cellule sparse che secernono e modificano la matrice. La consistenza della matrice è molto variabile e può generare tessuti a bassa densità come il sangue sino ad alta densità come l'osso.

Le cellule del tessuto connettivo, a seconda del loro grado di mobilità, si definiscono fisse oppure mobili. Il suffisso *-blasto* che segue il nome di una cellula del tessuto connettivo indica spesso una cellula capace di replicarsi, oppure in grado di secernere attivamente matrice extracellulare. I fibroblasti, infatti, sono cellule del tessuto connettivo che producono matrice ricca di collagene. Un esempio di linea cellulare di tessuto connettivo è la linea IMR90 di fibroblasti fetali umani (Figura 26) utilizzata in questo lavoro di tesi per indagare la selettività dei farmaci testati sulle cellule tumorali.

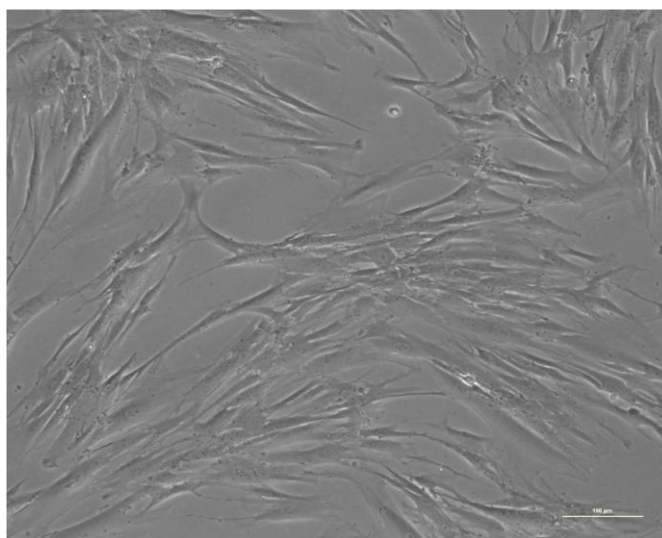


Figura 26: Linea di fibroblasti umani IMR90.

5.3. Terreno di coltura

Come anticipato in precedenza, il terreno di coltura è un elemento necessario per il mantenimento delle colture cellulari. Quello utilizzato in laboratorio ICM per la crescita delle linee U87 e IMR90 è il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Il terreno è sprovvisto dell'aminoacido glutammina che viene addizionato al terreno all'utilizzo per preservarne le proprietà: la glutammina ha infatti un'emivita breve di circa un mese. Il DMEM viene completato anche con antibiotici (penicillina-streptomina) e siero per le ragioni già ampiamente discusse in precedenza.

5.4. Piastre di Petri e piastre multipozzetto

La piastra di Petri è un recipiente di plastica o vetro avente forma cilindrica o circolare utilizzato in laboratorio soprattutto per il mantenimento delle colture cellulari ^[3]. Questa è costituita da due unità: una base sulla quale crescono, si sviluppano e si trattano le linee cellulari ed un coperchio che mantiene il contenuto al riparo da agenti estranei (Figura 27).

Spesso la superficie alla base è opportunamente trattata per favorire l'adesione delle cellule.

La piastra multipozzetto (comunemente detta multiwell) contiene un numero variabile di pozzetti: la più utilizzata è quella da 96 pozzetti. Avere a disposizione 96 pozzetti ha il vantaggio di poter testare contemporaneamente più condizioni sperimentali e effettuare diversi replicati biologici, come per esempio nei saggi in fluorescenza atti a indagare la vitalità cellulare (Figura 28).



Figura 27: Piastra di Petri.



Figura 28: Multiwell plate.

5.5. PBS

Tra i tamponi biologici il PBS è quello più comunemente usato. Il buffer è isotonico e non tossico per le cellule ed ha la proprietà di mantenerne l'osmolarità. In tal modo il tampone è adatto per le procedure di lavaggio delle colture cellulari. Tipicamente, infatti, viene

utilizzato nella fase di tripsinizzazione delle linee per eliminare i residui di terreno di coltura^[3].

5.6. Tripsina

Come già accennato, le linee cellulari in coltura aderiscono alla piastra. L'adesione, infatti, è un fenomeno attivo che richiede l'interazione dei recettori di membrana, le integrine, con le proteine adesive adsorbite sulla piastra di coltura e che solitamente sono presenti nel siero. La tripsina è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi, che catalizza il taglio proteolitico con specificità per l'arginina e la lisina e degrada le proteine della matrice che rendono le cellule aderenti alla piastra^[3]. La tripsina va mantenuta a -20°C per evitare che si degradi e attivata a 37°C prima del suo utilizzo.

5.7. Cappa a flusso laminare

La cappa utilizzata in laboratorio ICM 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 (Figura 29). La cappa a flusso laminare riduce significativamente la possibilità di contaminazioni crociate, consentendo un lavoro in condizioni di sterilità. Il flusso laminare costante (0.4 m/s +/- 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 filtrate da filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 che hanno un'efficienza del 99.999% per particelle di 0.3µm; 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 [Documentazione della cappa VBH] [www.univaq.it/sicurezza/rischio_biologico-15-02-05.pdf].

Per mantenere un ambiente di lavoro idoneo sia per le linee cellulari che per gli operatori è necessario adottare diversi accorgimenti. E' infatti buona norma pulire con alcool denaturato 70% ed acqua mQ la superficie della cappa prima e dopo il trattamento di ogni linea cellulare, tenere puliti anche gli aspiratori di liquidi mediante acqua mQ e candeggina, sterilizzare con alcool denaturato 70% ogni oggetto che si ha intenzione di inserire in cappa.

Strumenti e contenitori posti a contatto con le colture vengono sterilizzati e mantenuti sotto cappa, contenitori dotati di tappo a vite a tenuta possono essere portati fuori dalla cappa avendo l'accortezza di chiuderli ermeticamente per evitare possibili contaminazioni del materiale contenuto al loro interno. Al termine di ogni giornata di lavoro, per un'ulteriore sterilizzazione, vengono attivati i raggi UV all'interno della cappa. Essendo, questo tipo di radiazioni, fortemente nocive (possono procurare, ad esempio, danni agli occhi ed alla pelle), il personale di laboratorio è protetto mediante la presenza della schermatura in vetro la quale costituisce la chiusura ermetica della cappa stessa.



Figura 29: Cappa a flusso laminare.

5.8. Incubatore

L'ambiente fisico necessario alla crescita *in vitro* viene fornito dagli incubatori, strumenti capaci di mantenere temperatura e atmosfera controllate. Le cellule coltivate *in vitro* richiedono un controllo di temperatura rigoroso almeno quanto quello dell'organismo vivente; cellule di mammifero vengono comunemente coltivate a 37°C. La pressione parziale di CO₂ adatta alla coltura *in vitro* di cellule animali deve essere vicina a quella misurata all'interno dei tessuti (35-45 mmHg, pari al 4.6- 5.9% di CO₂), per questo motivo l'atmosfera all'interno degli incubatori è costituita al 95% da aria e al 5% da CO₂ ^[5]. Come accennato in precedenza le cellule, per la loro crescita, hanno bisogno di un valore di pH del mezzo compreso tra 7.2 e 7.4. Per mantenere costante tale valore di pH si ricorre, appunto, ad incubatori con una fase gassosa contenente il 5% di CO₂ e terreni contenenti NaHCO₃. Infatti, in soluzione acquosa il bicarbonato dissocia liberando CO₂. La CO₂

presente nell'incubatore tende a controbilanciare questo aumento, mantenendo così il giusto valore di pH del terreno ^[7] (Figura 30).



Figura 30: Incubatore per colture cellulari.

5.9. Microscopio a contrasto di fase

Il microscopio presente in laboratorio ICM è di tipo rovesciato a contrasto di fase. Il microscopio a contrasto di fase è un tipo particolare di microscopio che, analogamente al microscopio a luce trasmessa, lavora nel campo del visibile; inoltre si basa sul fenomeno dell'interferenza luminosa.

Il preparato viene illuminato da un fascio luminoso, in realtà suddiviso a livello del condensatore, in due porzioni di fase differente e con diverso angolo di incidenza. Il cambiamento ulteriore di fase dovuto alla porzione di luce che attraversa il campione, andandosi a ricombinare con la luce non rifratta, renderà visibili componenti trasparenti con indice di rifrazione differente da quello del mezzo. In campo biologico, la maggior parte dei componenti cellulari è trasparente alla luce visibile, anche a causa dell'elevata presenza di acqua, tuttavia si nota che le radiazioni luminose una volta oltrepassata una componente o un organello cellulare, subiscono dei cambiamenti di fase che dipendono sia

dallo spessore, sia dal diverso indice di rifrazione della struttura oltrepassata. Mediante il microscopio a contrasto di fase è possibile andare a determinare tali cambiamenti e convertirli in differenze di densità così da ottenere delle informazioni utili circa la composizione di cellule e tessuti analizzati. Questa tecnica di microscopia è molto utilizzata per l'osservazione delle colture cellulari; infatti, tramite la microscopia a contrasto di fase si evita l'utilizzo di coloranti e fissativi che spesso comportano notevoli alterazioni strutturali ottenendo così dei dati molto più reali di quella che è l'organizzazione cellulare (Figura 31) ^[3].



Figura 31: Microscopio.

6. Trattamenti farmacologici

I farmaci che sono stati valutati in questo lavoro di tesi svolgono una funzione chiave nella modulazione del meccanismo di regolazione epigenetica cellulare. In particolare, si è cercato di mettere in luce il loro ruolo nell'inibizione delle HDAC come punto di partenza per la sperimentazione di nuove terapie antitumorali.

Nelle attività sperimentali di laboratorio sono stati testati cinque coniugati poliamminici neosintetizzati (PC 1, PC 2, PC 3, PC 4, PC 5) in relazione allo Scriptaid, già noto per le sue forti capacità di inibizione delle HDAC e quindi di induzione di iperacetilazione

istonica, che svolge il ruolo di controllo positivo. Lo Scriptaid è una molecola di piccole dimensioni che diffonde in maniera non selettiva in ogni tipo di cellula: la mancata selettività per le cellule tumorali rappresenta un punto debole di tale tipologia di trattamento farmacologico. Come ribadito in precedenza, con la strategia di sintesi delle molecole PC si vuole sfruttare la coda poliamminica per direzionare i nuovi composti all'interno delle cellule tumorali in maniera selettiva per la presenza in membrana di trasportatori poliamminici sovrespressi o iperattivi, limitando invece il loro ingresso nelle cellule sane.

Sulla scia di esperimenti già proposti in precedenza da diversi gruppi di ricerca e di nuove evidenze sperimentali, si è cercato di creare composti morfologicamente idonei a questo tipo di scopi. I composti PC presentano tre componenti di fondamentale importanza: un acido idrossamico (inibitore delle HDAC), un gruppo naftalenediimide (intercalante il DNA con potenziale attività antitumorale e antiproliferativa) e una coda poliamminica.

Lo Scriptaid, a differenza degli altri composti, non presenta la coda poliamminica: il suo limitato ingombro strutturale ne asseconda l'ingresso in cellula per diffusione.

Tutti i farmaci sono stati somministrati sia singolarmente che in copresenza di un inibitore specifico dell'enzima chiave del processo metabolico delle poliammine all'interno della cellula: l'ornitina decarbossilasi (ODC). Tale inibitore, ampiamente utilizzato nelle ricerche sperimentali è l' α -difluorometilornitina (anche detto eflornitina o DFMO). Trattando le cellule con DFMO si inibisce la sintesi poliamminica all'interno della cellula promuovendo l'uptake di poliammine dall'ambiente extracellulare ricco dei farmaci PC che verranno internalizzati insieme alle poliammine naturali. Una volta che il farmaco ha avuto accesso al compartimento interno della cellula, la coda poliamminica svolgerà anche il compito di dirigere il composto, al di là della membrana nucleare, verso il DNA. Esso infatti è carico negativamente a causa dei numerosi gruppi fosfato e richiamerà per affinità elettrica le code poliamminiche policationiche. Nel nucleo il farmaco potrà svolgere le proprie funzioni tra le quali quella di inibizione delle HDAC.

I trattamenti con i diversi farmaci (Scriptaid, PC 1, PC 2, PC 3, PC 4, PC 5) in presenza e in assenza di DFMO, sono stati effettuati per entrambi i tipi di linee cellulari: U87 e IMR90. In particolare, la linea di fibroblasti è stata utilizzata per avere un quadro completo dei dati sperimentali e soprattutto per mettere in luce le potenziali doti di selettività dei

composti poliamminici. Per effettuare questo tipo di analisi è risultato indispensabile anche il trattamento con lo Scriptaid noto inibitore delle HDAC.

6.1. Alpha-difluorometilornitina, DFMO

Un inibitore enzimatico indica una molecola in grado di instaurare un legame chimico con un enzima, diminuendone così l'attività. L'inibitore infatti può intralciare l'enzima nella catalisi della sua reazione, per esempio impedendo al substrato di entrare nel sito attivo dell'enzima stesso. Il legame tra enzima ed inibitore può essere reversibile o irreversibile. Gli inibitori irreversibili solitamente reagiscono con l'enzima, modificando chimicamente residui amminoacidici fondamentali per l'attività. Al contrario, gli inibitori reversibili si legano non-covalentemente e producono diversi tipi di inibizione a seconda che si leghino all'enzima, al complesso enzima-substrato, o ad entrambi ^[3].

Il DFMO (Figura 32) appartiene alla classe di inibitori enzimatici irreversibili. In particolare inibisce l'ornitina decarbossilasi (ODC), enzima chiave nella biosintesi delle poliammine, che catalizza la decarbossilazione dell'ornitina (un prodotto del ciclo dell'urea) per formare putresceina ^[3].

La notevole importanza delle poliammine nei processi di proliferazione cellulare e l'evidenza del coinvolgimento delle stesse nei processi di cancerogenesi, ha stimolato la ricerca nei confronti di inibitori specifici della loro biosintesi. Il DFMO è stato il primo composto effettivamente e razionalmente ideato con il fine di diminuire il contenuto di poliammine nelle cellule. Nello specifico, esso si lega al sito attivo dell'ODC, viene decarbossilato, restando però legato covalentemente e portando, di conseguenza, ad una rapida inattivazione dell'enzima. Il trattamento di cellule in coltura con DFMO determina la diminuzione del contenuto intracellulare della putrescina e della spermidina, evento che causa un rapido arresto della crescita. Tale inibitore, infatti, ha un effetto citostatico piuttosto che citotossico ^[8].

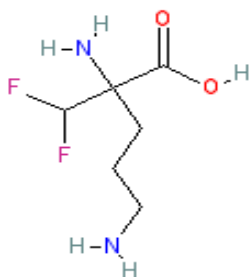


Figura 32: Struttura chimica del DFMO.

6.2. Scriptaid e coniugati poliamminici

Lo Scriptaid è un potente inibitore delle HDAC derivato dall'acido idrossamico. La sua struttura e formula chimica sono riportate in Figura 33. Studi pubblicati in letteratura hanno evidenziato che questo HDACi ha un effetto antiproliferativo in cellule tumorali provenienti da diversi tessuti e induce apoptosi.

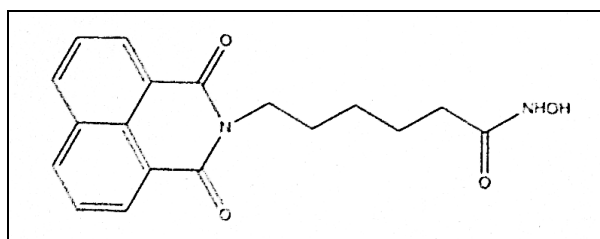
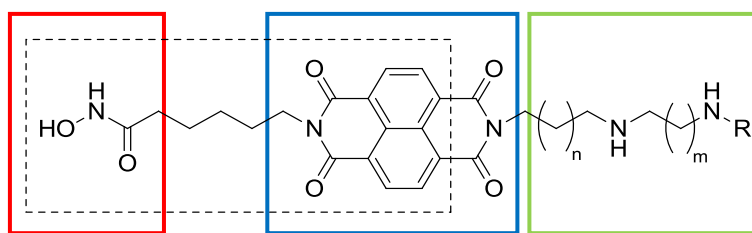


Figura 33: Scriptaid. Formula chimica: $C_{18}H_{18}N_2O_4$.

I composti poliamminici (PC 1, PC 2, PC 3, PC 4 e PC 5) che sono stati testati in questo lavoro di tesi presentano una struttura comune (Figura 34) che varia a livello della coda poliamminica. La variabilità di questa coda è stata introdotta al fine di trovare una molecola quanto più efficace e specifica nell'inibizione delle varie isoforme delle HDAC e quanto più selettiva per le cellule tumorali.



ACIDO IDROSSAMICO **INTERCALANTE** **CODA POLIAMMINICA**

Figura 34: Schema strutturale comune ai coniugati poliamminici.

Qui di seguito sono riportate le strutture molecolari e le corrispondenti formule chimiche dei cinque composti PC testati (Figura 35).

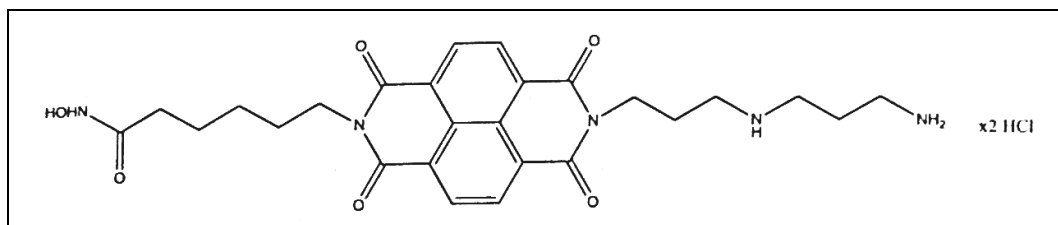


Figura 35a: PC 1. Formula chimica: $C_{26}H_{33}Cl_2N_5O_6$.

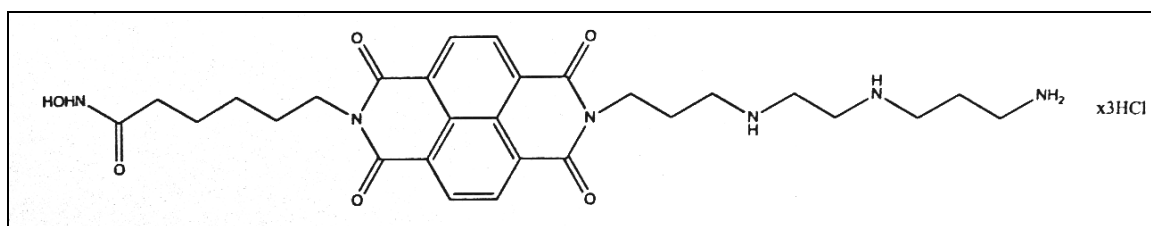


Figura 35b: PC 2. Formula chimica: $C_{30}H_{43}Cl_3N_6O_6$.

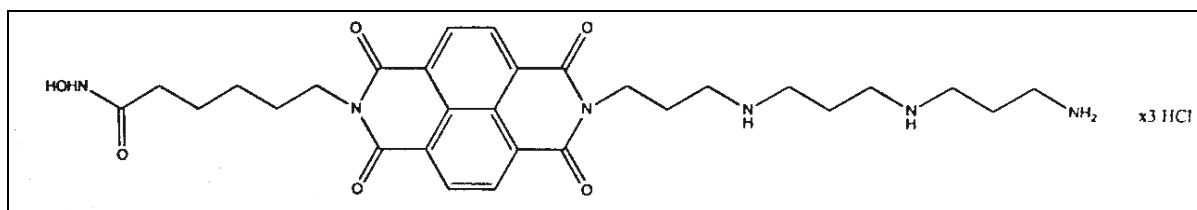


Figura 35c: PC 3. Formula chimica: $C_{29}H_{41}Cl_3N_6O_6$.

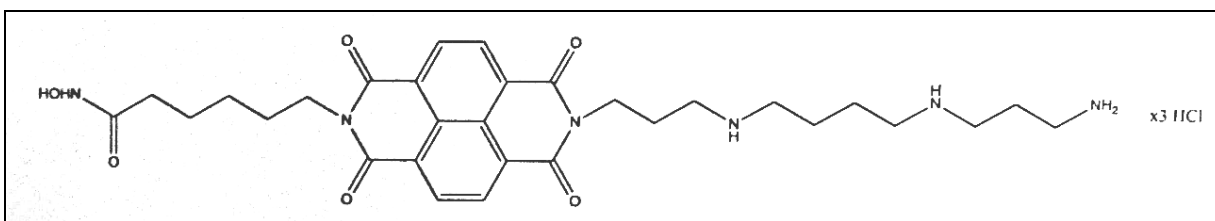


Figura 35d: PC 4. Formula chimica: $C_{28}H_{39}Cl_3N_6O_6$.

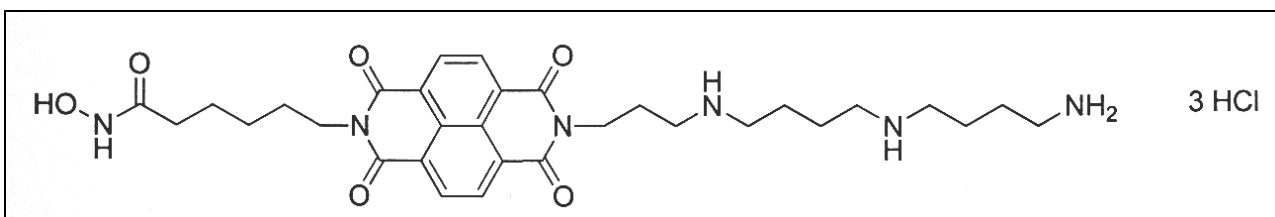


Figura 35e: PC 5. Formula chimica: $C_{31}H_{45}Cl_3N_6O_6$.

6.3. Conta delle cellule e semina

Per lo svolgimento di questa attività sperimentale, si è deciso di testare i cinque nuovi composti sulla sola linea cellulare tumorale di glioblastoma umano U87, con lo scopo di verificarne l'efficacia inibitoria delle HDAC; quello più promettente è stato poi testato oltre che sulle cellule U87 sui fibroblasti IMR90 al fine di valutarne la selettività per il fenotipo neoplastico. Gli effetti dei trattamenti sono stati valutati al livello della crescita cellulare e di inibizione delle HDAC verificando l'acetilazione globale indotta.

La semina delle cellule costituisce il punto di partenza per ogni tipo di esperimento in questione. Questa va effettuata 24 ore prima del primo trattamento in modo che le cellule abbiano il tempo di aderire alla piastra e si trovino nella fase esponenziale di crescita.

La prima linea d'indagine ha previsto esperimenti svolti solamente sulla linea cellulare U87, ognuno dei quali presentava 14 condizioni: controllo negativo, Scriptaid $5\mu\text{M}$ (controllo positivo), PC 1 $5\mu\text{M}$, PC 2 $5\mu\text{M}$, PC 3 $5\mu\text{M}$, PC 4 $5\mu\text{M}$, PC 5 $5\mu\text{M}$ testati singolarmente o in combinazione con DFMO 5mM ; in questo caso è stato previsto un giorno di pretrattamento con solo DFMO 5mM al fine di indurre deplezione di poliammine.

Gli effetti dei trattamenti sono stati valutati rispetto alla condizione di controllo, ovvero la linea cellulare senza aggiunta di farmaci od inibitori enzimatici. La condizione sperimentale relativa al trattamento con Scriptaid funge da controllo positivo di iperacetilazione indotta da inibizione delle HDAC e quindi da termine di paragone per quantificare l'efficacia dei composti poliamminici.

Per valutare, invece, il guadagno in selettività nell'utilizzo di tali farmaci e quindi il beneficio nell'utilizzare questo tipo di terapie rispetto ad altre ugualmente o maggiormente efficaci nell'indurre iperacetilazione, il farmaco risultato più promettente nel trattamento delle U87, il PC 3, è stato testato anche sulla linea sana di fibroblasti IMR90. Sono state effettuate sei condizioni sperimentali per ogni linea cellulare (U87 e IMR90): controllo (assenza di HDACi), Scriptaid 5 μ M e PC 3 5 μ M in presenza o assenza di DFMO 5mM.

Per seminare lo stesso quantitativo di cellule per piastra, e quindi avere risultati ripetibili, è necessario quantificare la concentrazione delle cellule nella sospensione di partenza. A tale scopo si utilizza la camera di conta (vedi paragrafo 6.4).

Sono state seminate 500 000 cellule in 7 mL di terreno per piastra da 58 cm² di superficie, per l'analisi in Western Blotting dell'acetilazione istonica e 1000 cellule per pozzetto da 0,35 cm² di superficie in 100 μ L di terreno per i test di vitalità.

6.4. Camera di conta

Per seminare le cellule a un quantitativo prefissato è necessario conoscere, come già accennato, la concentrazione delle cellule nella soluzione a nostra disposizione. Il conteggio delle cellule viene effettuato mediante la camera di conta, anche detta camera di Burker o emocitometro (Figura 36).

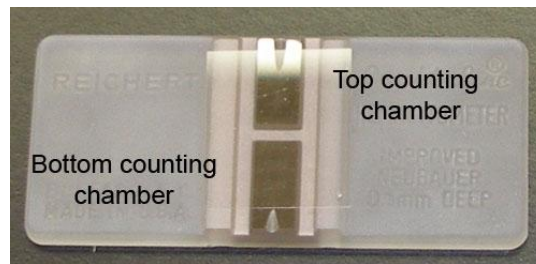


Figura 36: Emocitometro.

La camera è costituita da una base contenente due siti per la conta (uno superiore ed uno inferiore) e un vetrino coprioggetto che posto sulla base creerà uno spazio di volume pari a $10\mu\text{L}$ dove introdurre la sospensione cellulare. Dato che solitamente la soluzione cellulare a disposizione tende ad essere molto concentrata per limitare gli errori nella fase di conta, si procede spesso con una diluizione intermedia. Per risalire dal numero di cellule nella camera al valore della concentrazione della sospensione cellulare di partenza è necessario comprendere come si presenta la camera di conta. Questa è costituita da una camera con uno spessore di $0,1\text{ mm}$ e da 9 reparti a forma quadrata, i cui lati sono di 1 mm (Figura 37). In tutto, le cellule che si conteranno a livello di ogni singolo quadrato saranno immerse in un volume pari a $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{ mm}^3$ che equivale a $0,1\ \mu\text{L}$.

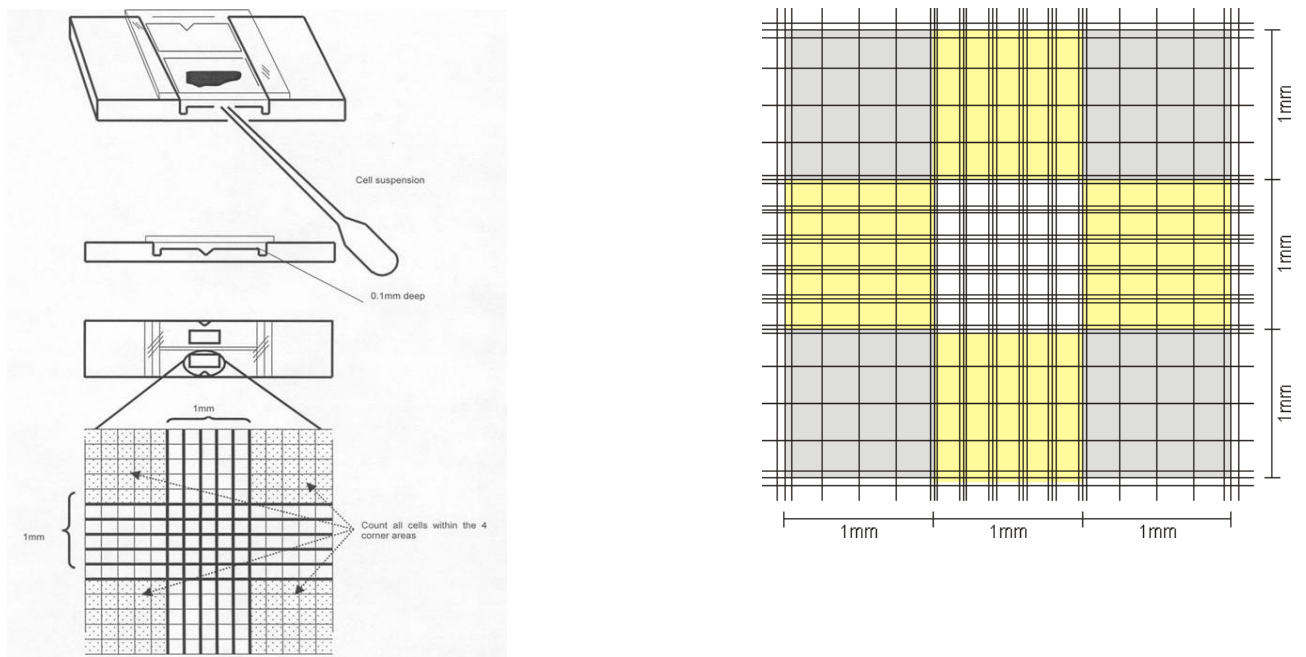


Figura 37: A sinistra: struttura della camera di conta; a destra: dettaglio della camera di conta.

Per limitare l'errore nella conta si contano le cellule di almeno 3 quadrati e si fa la media matematica dei tre valori. Il numero di cellule per millilitro sarà dato dal numero medio di cellule per quadrato moltiplicato per 10^4 , che deriva dalla conversione di $0.1 \mu\text{L}$ in mL, e per il fattore di diluizione effettuato. Ad esempio se si contano 3 quadrati e si parte da una sospensione cellulare diluita 1:3, la concentrazione delle cellule nella sospensione di partenza si ottiene con la seguente espressione:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ di cellule (somma di quelle contate in tre camere)}}{3} \cdot 3 \cdot 10^4$$

Numero medio di cellule per quadrante della camera di conta Fattore di diluizione (1:3) Fattore di conversione da $0,1\text{mm}^3$ a mL

6.5. Modi e tempi di trattamento

Passate 24 ore dalla semina delle cellule, si è proceduto con la somministrazione di DFMO 5mM laddove era previsto senza cambiare il terreno. Il DFMO deve essere preparato fresco ogni volta prima del suo utilizzo. Si prepara una soluzione in PBS di DFMO 1M; sotto cappa sterile si procede poi con il suo filtraggio con una siringa e un filtro con pori da 0,2 μm . Si somministra la quantità appropriata di DFMO 1M per ottenere una concentrazione finale di 5mM, eventualmente partendo da una soluzione intermedia 100 mM. Dopo 24 ore di trattamento con solo DFMO si passa alla somministrazione di Scriptaid e coniugati poliamminici in assenza o presenza di nuovo DFMO 5mM in terreno fresco. Gli effetti dei farmaci con azione riconosciuta o potenziale inibitoria delle HDAC sono stati valutati alle 24 ore di trattamento con concentrazione finale di 5 μM .

7. Test di vitalità

Il test di vitalità è un saggio colorimetrico basato sull'utilizzo dell'AlamarBlue®, un colorante che vira di colore e diventa fluorescente in relazione al quantitativo di cellule vive con cui è a contatto. L' AlamarBlue sfrutta il naturale potere riducente delle cellule vitali nel convertire la resazurina nella molecola fluorescente resorufina. Nel momento in cui entra nella cellula, la resazurina viene ridotta in resorufina, la quale produce una fluorescenza di colore rosso molto luminosa. La misura della fluorescenza fornisce quindi una stima dell'attività metabolica cellulare che sarà proporzionale al numero di cellule vive. Questo saggio è un metodo rapido, sensibile e poco costoso.

Dopo aver aspirato il terreno coi farmaci dalla multiwell, sono stati dispensati 100 μL per pozzetto di terreno addizionato con 10% di AlamarBlue. Si lascia la multiwell in incubatore a 37°C per 2 ore e si procede alla lettura di assorbanza o fluorescenza in lettore

per piastre multipozzetto ad una lunghezza d'onda d'eccitazione di 570 nm e di emissione di 590 nm (Figura 38).



Figura 38; Lettore per multiwell Tecan infinite M200.

7.1. Elaborazione dei dati del test di vitalità

Per ottenere valori paragonabili delle varie condizioni sperimentali di trattamento, i dati relativi alla fluorescenza dei vari pozzetti sono stati normalizzati. Per prima cosa è stato sottratto il valor medio dei pozzetti del “bianco” (terreno senza cellule ne trattamento) al valore di fluorescenza dei singoli pozzetti, per sottrarre l'autofluorescenza del terreno. Successivamente è stato calcolato il valore medio di fluorescenza e la deviazione standard dei pozzetti relativi ad ogni condizione sperimentale, solitamente quattro pozzetti per trattamento.

Per quantificare l'effettivo incremento/decremento del numero di cellule rispetto alla situazione di controllo priva di farmaci, si è passati alla normalizzazione dei risultati rispetto al valore medio di fluorescenza dei pozzetti relativi alla condizione di controllo in presenza o assenza di DFMO. In questo caso la deviazione standard va calcolata considerando che essa, di fatto, risulta essere la deviazione standard del rapporto di due variabili aleatorie: media del valore di fluorescenza dei campioni trattati sulla media del valore di fluorescenza dei campioni nella condizione di controllo in assenza di DFMO.

8. Western Blotting

Il Western Blotting è una tecnica di laboratorio sfruttata nella presente attività di ricerca per quantificare il livello di acetilazione istonica degli istoni H3 e H4 a livello dei residui di lisina presenti nelle rispettive code. Tale tecnica prevede la raccolta delle proteine con relativo dosaggio, corsa elettroforetica, trasferimento delle proteine su nitrocellulosa, immunorivelazione mediante anticorpi specifici per le forme acetilate degli istoni H3 (residui di lisina 9 e 14 acetilati) e H4 (residui di lisina 5, 12, 16 e 18 acetilati).

8.1. Raccolta delle cellule, estrazione delle proteine e loro dosaggio

Per proseguire nell'analisi dell'acetilazione istonica e quindi per eseguire il Western Blotting, è necessario, per prima cosa, raccogliere le cellule trattate in coltura ed estrarre le proteine.

Le cellule sono state lavate con PBS per eliminare i residui di terreno. Dopo aver aggiunto altro PBS e posto la piastra in ghiaccio le cellule sono state distaccate meccanicamente dalle piastre mediante l'utilizzo di scraper. Una volta raccolte in PBS e centrifugate, è stato eliminato il surnatante e il pellet è stato risospeso in un piccolo volume di PBS addizionato degli inibitori di proteasi per bloccare l'azione degli enzimi degradanti le proteine e trasferito in provette più piccole. Dopo un secondo passaggio in centrifuga il surnatante è stato eliminato e il pellet di cellule conservato a -80°C ; il congelamento permette di facilitare la rottura delle membrane cellulari e quindi l'estrazione delle proteine. Le operazioni sopra citate sono state svolte in ghiaccio per evitare la degradazione delle proteine.

L'estrazione delle proteine è stata effettuata con un detergente il sodio dodecilsolfato (SDS) alla concentrazione del 4% e un passaggio in colonnine di omogenizzazione (Qiashredder, Qiagen).

Dopo la purificazione in colonnina si procede al dosaggio delle proteine cioè alla quantificazione delle concentrazioni delle proteine relative alle varie condizioni

sperimentali. A questo scopo si utilizza un saggio colorimetrico basato sull'acido bicinconinico (BCA) che vira colore in relazione alla quantità di proteine presenti. Misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 560 nm allo spettrofotometro dei vari campioni in relazione ad una retta di calibrazione creata con una proteina di riferimento, la BSA (sieroalbumina bovina) si risale alla concentrazione dei campioni incogniti (Figura 39).

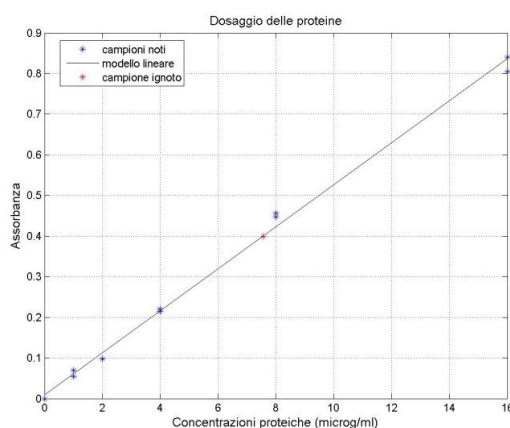


Figura 39: Retta di calibrazione.

8.2. SDS-PAGE

Le proteine possono essere discriminate in base al peso molecolare attraverso un processo chiamato elettroforesi su gel di poliacrilammide (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE). Quest'ultima infatti è un polimero che attraverso i numerosi legami incrociati si oppone alla migrazione delle proteine, separandole in proporzione alla loro massa e carica. Il moto delle proteine sottoposte a un campo elettrico (E) è determinato dalla mobilità elettroforetica μ , definita come:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

dove V è la velocità della particella, Z è la carica netta della molecola e f è il coefficiente frizionale. La mobilità di una proteina dipende quindi dalla sua carica, dalla massa e dalla

forma. Per rendere la migrazione delle proteine dipendente soltanto dalla loro massa, gli estratti proteici vengono bolliti in acqua dopo aver addizionato SDS e Ditiotreitolo (DTT). La bollitura consente di linearizzare la molecola mentre il DTT è in grado di rompere i ponti disolfuro, impedendo che la proteina riacquisti la caratteristica struttura secondaria e terziaria; l'SDS invece, con interazioni idrofobiche, si lega alla molecola linearizzata in misura pari a circa una molecola ogni due residui amminoacidici conferendo alla proteina una carica proporzionale alla sua massa e annullando la carica intrinseca della proteina. Dopo aver dosato i campioni si provvede a diluirli per averli tutti alla medesima concentrazione. Si aggiunge quindi DTT e loading buffer, che contiene SDS (o eventualmente LDS), un colorante in grado di individuare la posizione delle proteine durante la corsa elettroforetica e saccarosio che ne aumenta la densità facilitando il caricamento nel gel (Figura 40).

Il gel per l'SDS-PAGE è costituito da due parti:

- stacking gel: è la parte superiore del gel; la concentrazione di poliacrilamide in esso contenuta, piuttosto bassa (4%), permette di allineare le proteine in ingresso al gel di corsa;
- running gel: è la parte inferiore del gel; esso ha la funzione di discriminare le proteine in base alla concentrazione di poliacrilamide utilizzata (7%-15%): basse concentrazioni separano meglio proteine di alto peso molecolare, viceversa alte concentrazioni discriminano meglio proteine di basso peso molecolare (Figura 41).

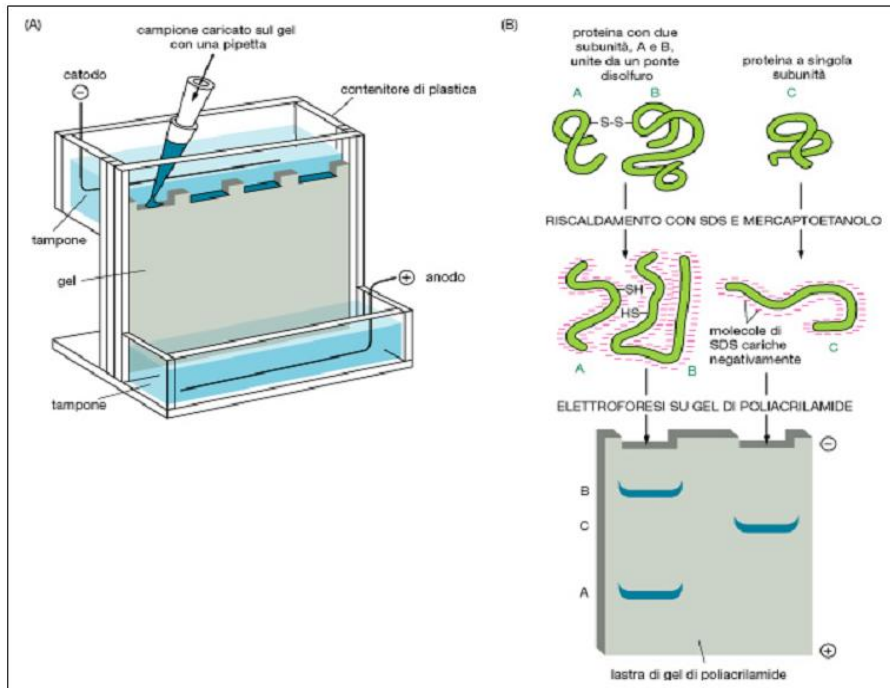


Figura 40: Preparazione delle proteine e corsa elettroforetica.

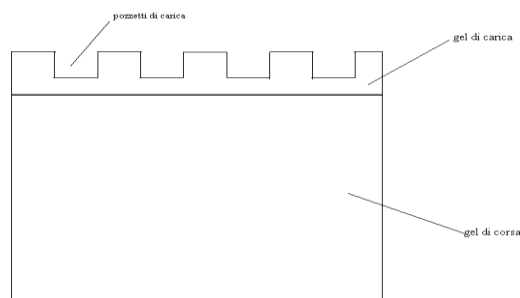


Figura 41: Struttura di un gel per SDS-PAGE: running e stacking gel.

In laboratorio sono stati utilizzati gel già polimerizzati pre-cast. Dopo averli montati nella cella elettroforetica e aver riempito la camere del buffer di corsa (la soluzione tampone a base di glicina, Tris e SDS che permette la trasmissione del campo elettrico); si rimuove l'apposito pettine inserito nel gel al momento della polimerizzazione con lo scopo di creare i pozzetti dove caricare i campioni. Si caricano quindi i campioni nei pozzetti, includendo il marcatore di peso molecolare (Mw), cioè una miscela commerciale di proteine di peso noto che, dopo la corsa, permetteranno, per confronto, di individuare i pesi molecolari

delle proteine di interesse. Sottoposte al campo elettrico le proteine si stratificheranno in bande lungo il gel, le più leggere correranno più velocemente, le più pesanti più lentamente. (Figura 42).

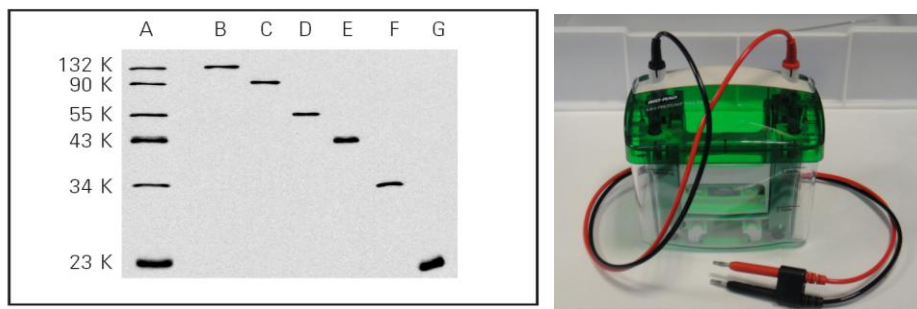


Figura 42: Corsa elettroforetica. A sinistra: marker e corsa delle proteine; a destra: cella elettrofotetica.

Si lasciano correre i campioni finché il colorante blu del marcatore, presente anche nel loading buffer, arriva al fondo del gel di corsa.

8.3. Trasferimento su nitrocellulosa (blotting)

Per proseguire l'analisi del Western Blotting è necessario poter operare con un supporto più resistente del gel usato per la corsa elettroforetica che ha la consistenza di una gelatina; perciò, con un ulteriore processo elettroforetico, si trasferiscono le proteine su un foglio di nitrocellulosa (consistenza simile alla carta), applicando un campo elettrico perpendicolare al gel. L'orientamento della nitrocellulosa rispetto al gel è riportato nella figura 43.



Figura 43: Orientamento della nitrocellulosa rispetto al gel.

La fase di blotting ha l'ulteriore scopo di porre le proteine prima immerse nel gel sulla superficie della nitrocellulosa in modo che possano essere riconosciute nella fase successiva. Il trasferimento in laboratorio ICM viene effettuato in modalità semi-dry, in modo da limitare i tempi di trasferimento (Figura 44).

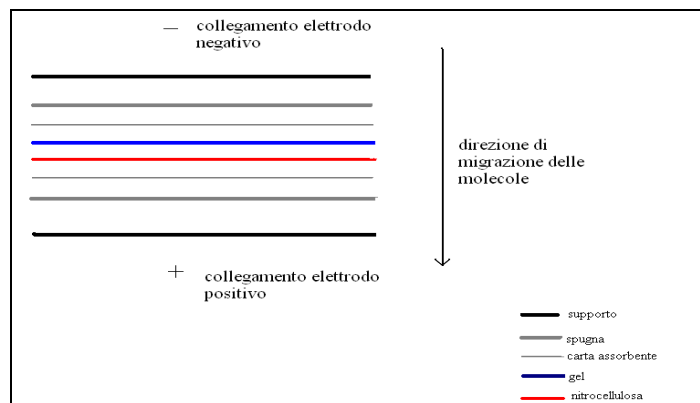
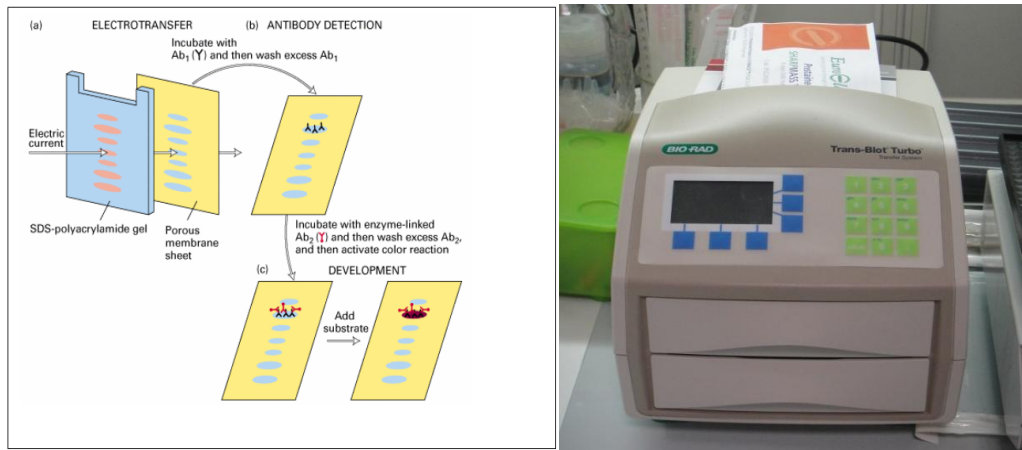


Figura 44: In alto a sinistra: trasferimento su nitrocellulosa delle proteine da gel; in alto a destra: esempio di strumento utilizzato per il trasferimento su nitrocellulosa; in basso: direzione di migrazione delle molecole.

A questo punto la nitrocellulosa è pronta per essere incubata con gli anticorpi specifici per le proteine di interesse. Gli anticorpi sono proteine che riconoscono precisi antigeni, cioè porzioni di altre proteine corrispondenti a segmenti di circa 25 amminoacidi. Normalmente

si usa un sistema basato su due tipi di anticorpi: uno primario e uno secondario. Il primo anticorpo (primario) si lega al substrato cercato; gli anticorpi secondari portatori di un marcatore, riconoscono invece il primario in modo da determinare amplificazione del segnale. Il marcatore può essere un fluoroforo fluorescente o un enzima che catalizza una reazione che genera un substrato colorato o un segnale luminescente (Figura 45).

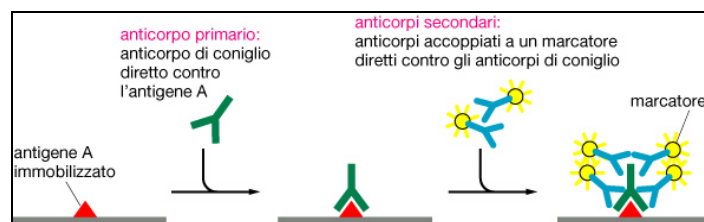


Figura 45. Sistema di riconoscimento con anticorpo primario e secondario.

Nel Western Blotting si usano anticorpi secondari marcati con l'enzima perossidasi (HRP) che catalizza la reazione di chemiluminescenza del luminolo in presenza di acqua ossigenata. La radiazione luminosa generata è in grado di impressionare una lastra fotografica o essere quantificata da una telecamera CCD (Figura 46).



Figura 46: Strumento per la rilevazione della radiazione luminosa.

Gli anticorpi utilizzati in questo lavoro di tesi sono specifici per l'identificazione dei residui di lisina acetilati a livello delle code istoniche degli istoni H3 ed H4 (acH3, acH4). I segnali specifici per acH3 e acH4 possono essere normalizzati rispetto a una proteina equi presente in ogni campione, che fungerà quindi da controllo di carica, come per esempio la Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Questa proteina, in particolare, è un enzima che partecipa attivamente al metabolismo di glicolisi cellulare e perciò si trova espressa in maniera uniforme in ogni tipo cellulare.

Alternativamente bio-rad ha messo a punto un sistema di normalizzazione rispetto alle proteine totali presenti nel campione: il principio si basa su una modifica indotta dai raggi UV sui residui di triptofano, un amminoacido con catene laterali aromatiche, relativamente non polare (idrofobico), contenuti nelle proteine. Questa modifica rende il triptofano fluorescente quando eccitato con radiazione UV e permette quindi di poter visualizzare tutto il contenuto proteico di un campione. L'azienda bio-rad commercializza gel pre-cast chiamati stain-free basati su questo principio: dopo aver attivato il gel con UV al termine della corsa elettroforetica, è possibile visualizzare la stratificazione delle proteine e a seguito del blotting verificare e quantificare le proteine trasferite (Figura 47).

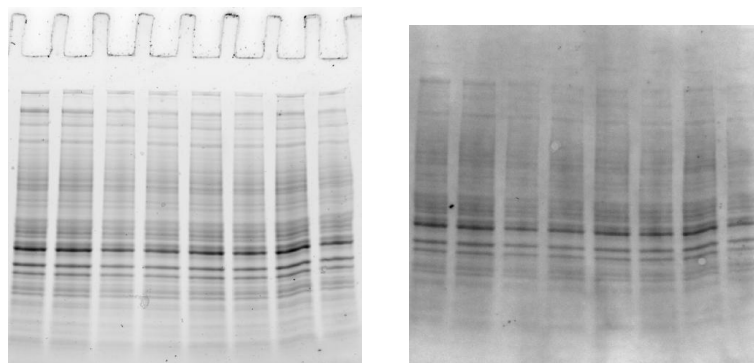


Figura 47: Visualizzazione della corsa elettroforetica su gel (a sinistra) e del trasferimento su nitrocellulosa (a destra) attraverso il sistema stain-free.

8.4. Elaborazione dei dati del Western Blotting

L'immagine digitale, ottenuta con il sistema a telecamera CCD presente in laboratorio ICM (Chemidoc MP, bio-rad), può essere elaborata con opportuni software con il fine di

estrarre un'informazione relativa alla quantità delle proteine, attraverso la densitometria ottica delle bande.

Nel caso del Western Blotting finalizzato alla quantificazione dei livelli di acetilazione degli istoni H3 e H4, si ottengono immagini con bande specifiche, riconoscibili per confronto con il marcatore di peso molecolare, per le singole proteine: la forma acetilata di H3 e H4 hanno peso molecolare di 17 kDa, e 10 kDa rispettivamente, mentre la proteina GAPDH è visualizzata all'altezza dei 37 kDa, come evidenziato nella figura 48.

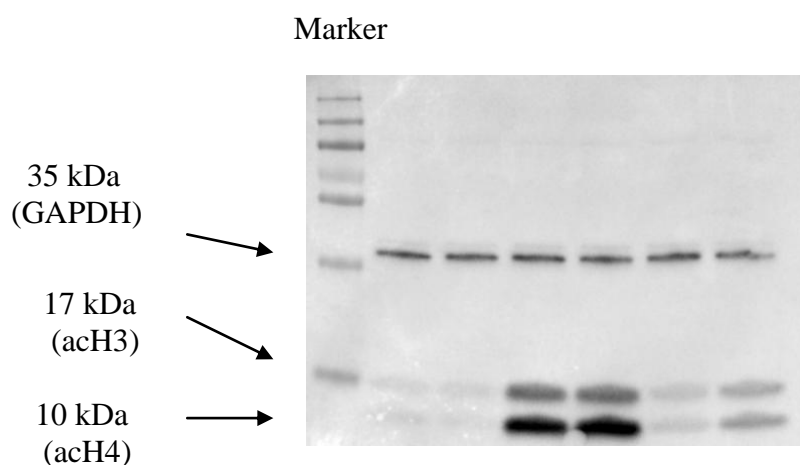


Figura 48: Esempio di immagine ottenuta in chemiluminescenza con lo strumento Chemidoc (bio-rad). Sono distinguibili le bande relative alle proteine GAPDH, acetil-H3 e dell'acetil-H4, e il marcatore di peso molecolare sulla sinistra.

E' possibile quantificare la densitometria ottica delle singole bande di interesse attraverso il software di analisi dell'immagine Image Lab™ connesso allo strumento di visualizzazione di gel presente in laboratorio ICM.

Attraverso la funzione "Volume Tools" il software permette di disegnare delle sezioni rettangolari che racchiudano le singole bande di interesse e quantificarne quindi la densitometria ottica, normalizzata sull'area della sezione e sottratta del valore di background nell'intorno della sezione (Figura 49). I dati possono essere poi esportati su un foglio di lavoro excel per ulteriori elaborazioni.

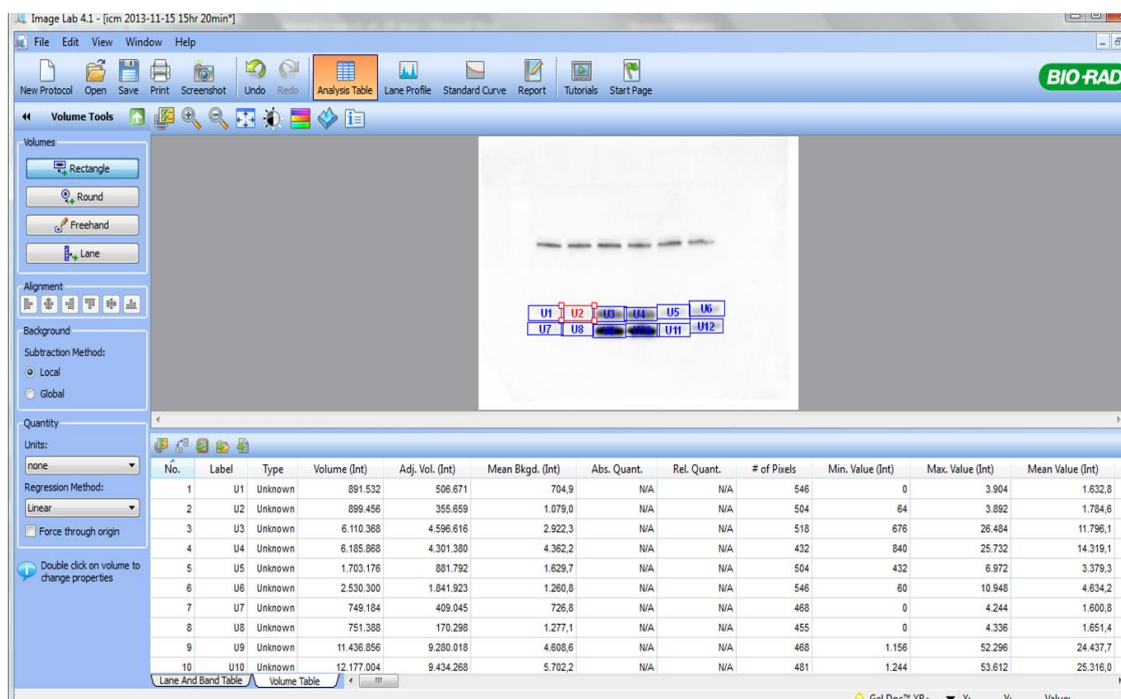


Figura 49: Esempio di interfaccia grafica che si presenta dopo aver disegnato le bande e lanciato la quantificazione.

La densitometria ottica delle bande relative alla proteina di interesse (es. acH3 o acH4) di ogni campione, specifico per una condizione sperimentale (es. vari trattamenti farmacologici) deve essere normalizzata rispetto al relativo valore di GAPDH o di proteine totali quantificate dalla nitrocellulosa con in sistema stain-free. In questo modo è possibile mettere a confronto i risultati relativi ai trattamenti e compensare situazioni in cui, per esempio, l'acetilazione istonica di H3 risulti maggiore a seguito di trattamento con un farmaco rispetto ad un altro a causa di differenti quantitativi di proteina totale caricati nei rispettivi pozzetti del gel.

Per determinare infine se una condizione sperimentale determini maggior o minor espressione della proteina di interesse rispetto alla condizione di controllo, occorre normalizzare il dato della proteina precedentemente normalizzato rispetto a GAPDH o proteine totali, rispetto al corrispettivo della condizione di controllo. In questo modo sarà possibile confrontare le diverse condizioni di trattamento farmacologico e determinare l'efficacia dei singoli farmaci.

I valori numerici così ottenuti possono essere visualizzati sotto forma di istogramma per rendere più immediato il confronto tra le varie condizioni sperimentali.

RISULTATI E DISCUSSIONE

9. Valutazione degli effetti dei coniugati poliamminici sulla linea tumorale U87

9.1. Analisi della vitalità

Mediante un primo test di vitalità eseguito sulla linea cellulare U87 sono state analizzate le diverse influenze sulla crescita cellulare dei vari composti poliamminici in esame (PC 1-5), somministrati in presenza o assenza di trattamento con DFMO. Alle cellule è stato somministrato 5mM di DFMO, o nessun farmaco per 24 ore; le cellule sono state poi trattate per altre 24 ore con 5 μ M di Scriptaid o dei vari PC, in combinazione o meno con 5mM di DFMO. Al termine è stata quantificata la vitalità con AlamarBlue.

Il grafico riportato in figura 50 mostra i risultati ottenuti della media di tre esperimenti analoghi con relative deviazioni standard che indicano il grado di ripetibilità e attendibilità dei dati ottenuti.

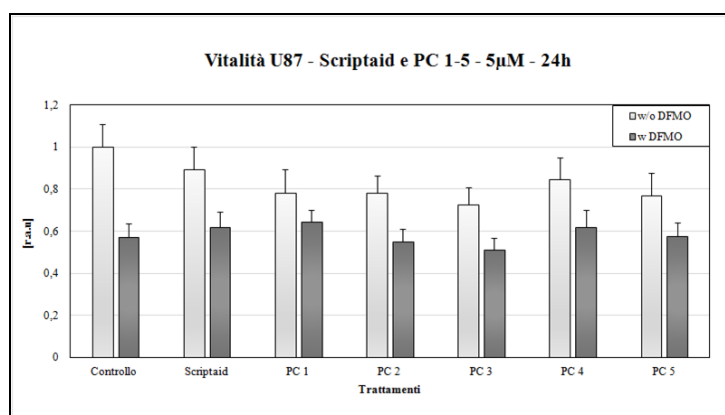


Figura 50: Vitalità cellulare testata a seguito del trattamento con i diversi composti poliamminici (PC 1-5) in presenza (w) o assenza (w/o) di DFMO in relazione alla condizione di controllo e di trattamento con l'HDACi, Scriptaid.

Si noti che tutti i farmaci in assenza di trattamento con DFMO comportano una riduzione contenuta della crescita cellulare tra il 10 e 20% rispetto alla condizione di controllo. L'inibizione maggiore si registra quando le cellule sono trattate con il composto PC 3, che determina un decremento, che resta comunque non significativo rispetto alla condizione di controllo, del 27%.

Risulta più difficile, invece, valutare le diverse influenze dei singoli composti poliamminici se somministrati in copresenza di DFMO: l'effetto citostatico di tale inibitore, che blocca le cellule in fase di crescita cellulare G1-G2, infatti, prevale su quello dei farmaci. Anche in questo caso la variabilità è decisamente contenuta: i livelli di crescita cellulare tendono a mantenersi tra il 40% e il 50% per tutti i composti, rispetto alla condizione di controllo.

L'analisi di vitalità effettuata alle 24 ore di trattamento valuta semplicemente il grado di attività cellulare a seguito di trattamenti farmacologici; per studiare le caratteristiche di citotossicità dei singoli composti poliamminici sarebbe invece necessario valutare la vitalità e quindi la crescita cellulare a tempi maggiori rispetto quelli di trattamento.

Con questo esperimento è stato possibile valutare, perciò, se i trattamenti comportassero un'inibizione tale da non permettere eventuali analisi quali quella dell'acetilazione istonica e se presentassero caratteristiche molto differenti tra loro come inibitori di crescita cellulare.

Dato che le cellule, post-trattamento farmacologico, sono risultate in numero sufficiente, si è proceduto con la valutazione dell'acetilazione istonica dei singoli farmaci sulla linea U87 mediante Western Blotting.

9.2. Western Blotting linea cellulare U87

Le cellule U87 sono state trattate seguendo lo schema indicato (\pm 24 hs DFMO 5mM + 24 hs HDACi 5 μ M \pm DFMO 5mM). Sono state condotte tre prove indipendenti che mostrano lo stesso trend di efficacia di induzione indiretta di iperacetilazione dei vari composti. Nelle figure 51 e 52 sono riportati i dati rappresentativi di uno di questi esperimenti. La prima immagine mostra le bande relative alle forme acetilate degli istoni H3 e H4 (acH3 e

acH4), mentre nella seconda è riportato l'istogramma relativo alla quantificazione della loro densitometria ottica. Non è stato possibile mediare i risultati dei tre esperimenti indipendenti perché presentano dati in valore assoluto variabili, probabilmente a causa della perdita di efficienza degli anticorpi e di una potenziale perdita di efficacia dei farmaci nel tempo, imputabile probabilmente a una loro degradazione. I PC infatti sono nuove molecole, delle quali rimane da precisare la shelf-life.

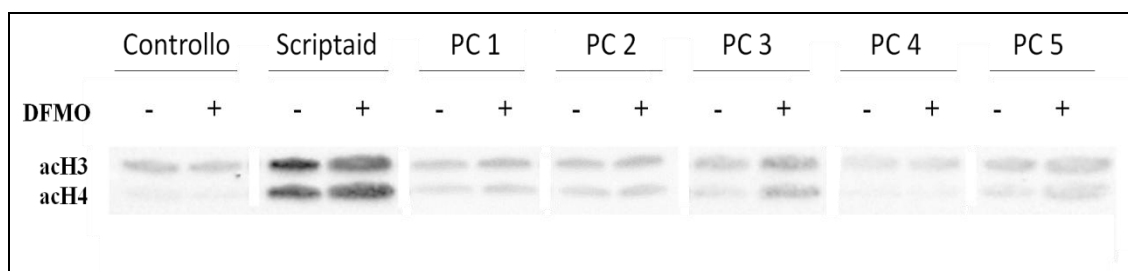


Figura 51: Bande specifiche per le forme acetilate di H3 ed H4 relative ai diversi composti somministrati in presenza o assenza di DFMO.

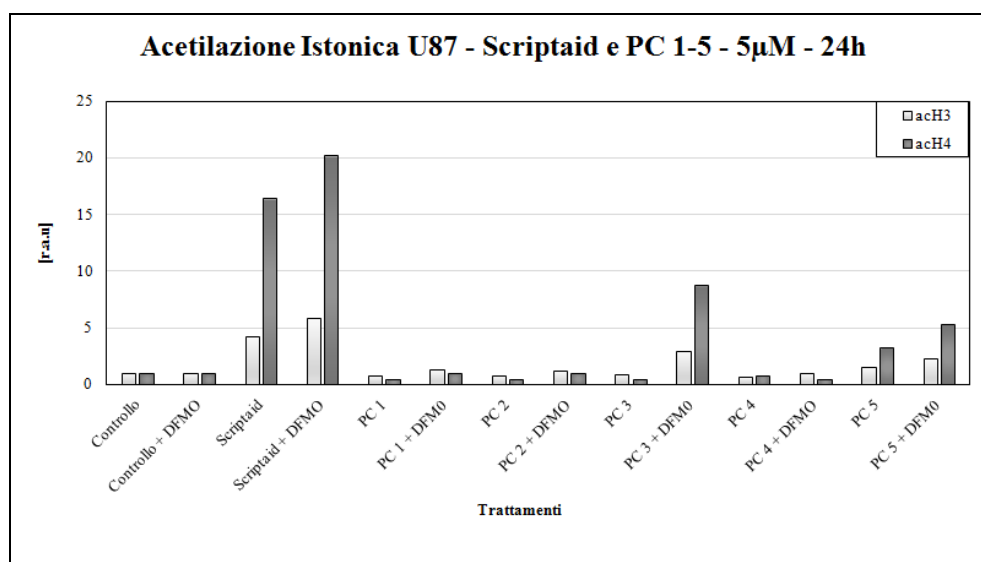


Figura 52: Iistogramma relativo alla quantificazione della densitometria ottica delle bande specifiche per l'acH3 e caH4 del western blotting riportato in figura 50.

Si noti, come ben evidenziato nell'istogramma, che lo Scriptaid è il composto che comporta i maggiori livelli di acetilazione istonica sia in assenza sia in presenza di trattamento con DFMO.

I coniugati poliamminici (PC 1-5) utilizzati in assenza di DFMO non risultano avere un'elevata efficacia nell'inibizione delle HDAC, visto che i livelli di acetilazione sono paragonabili alla situazione di controllo.

In combinazione con il DFMO invece, i farmaci PC 3 e PC 5, in particolar modo, mostrano promettenti capacità di induzione indiretta di iperacetilazione istonica: il PC 3 determina un incremento dell'acetilazione degli istoni H3 e H4 pari a circa 3 e 9 volte rispettivamente, rispetto alla condizione di controllo delle stesse cellule trattate con solo DFMO; mentre il PC 5 determina livelli di acH3 e acH4 di circa 2 e 5 volte maggiori rispetto alla stessa condizione di controllo. Seppur meno efficaci dello Scriptaid nell'indurre iperacetilazione i composti PC 3 e PC 5 risultano comunque promettenti inibitori delle HDAC nella condizione di deplezione di poliammine indotta da trattamento con DFMO. Questo risultato ha indotto il proseguimento dell'analisi con la valutazione della selettività del farmaco PC 3 per cellule tumorali aventi il sistema di trasporto delle poliammine iperattivo. PC 3 è stato preferito al 5 anche perché *in vitro* ha mostrato la dose IC_{50} , cioè la dose che determina inibizione dell'attività delle HDAC pari al 50%, inferiore a quella specifica per tutti gli altri composti testati (Figura 53).

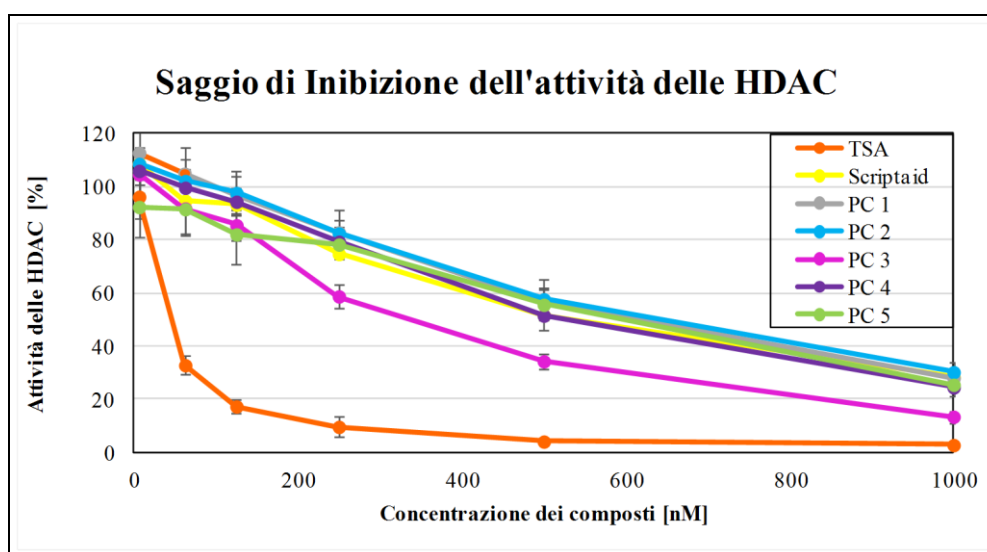


Figura 53: Valutazione del grado di inibizione dell'attività delle HDAC dovuto ai singoli composti.

10. Valutazione della selettività del composto PC 3 per la linea tumorale U87 a confronto con la linea sana IMR90

10.1. Analisi della vitalità sulle linee cellulari U87 e IMR90

Per valutare le potenzialità del composto poliamminico PC 3 come farmaco selettivo per le cellule tumorali si è deciso di utilizzare, oltre alla linea immortalizzata di cellule di glioblastoma U87, una linea cellulare di fibroblasti fetali sani, IMR90.

Seguendo il solito schema di somministrazione, il composto PC 3 è stato testato su entrambe le linee in presenza o assenza di DFMO, paragonandone gli effetti con i risultati relativi alla condizione di controllo o di trattamento con Scriptaid. Il grafico riportato in figura 54 mostra il valor medio della vitalità di tre esperimenti indipendenti con le relative deviazioni standard.

È possibile notare che in assenza di trattamento con DFMO, il PC 3 determina inibizione della crescita della linea tumorale U87 pari al 17% rispetto alla condizione controllo; mentre non si evidenziano influenze significative sulla crescita della cellule sane. Quindi, già a livello dell'inibizione di crescita cellulare, il PC 3 si mostra potenzialmente selettivo. Anche in questo caso tuttavia quando viene somministrato DFMO si nota che la vitalità subisce in tutte le condizione sperimentali compreso quella di controllo, un decremento che si mantiene tra il 30% ed il 40%, indipendentemente dal tipo di farmaco con cui viene associato (Scriptaid o PC 3) e dalla linea cellulare presa in esame (U87 o IMR90). Un'inibizione così significativa della vitalità è da imputare, ancora una volta, agli effetti citostatici indotti dal DFMO.

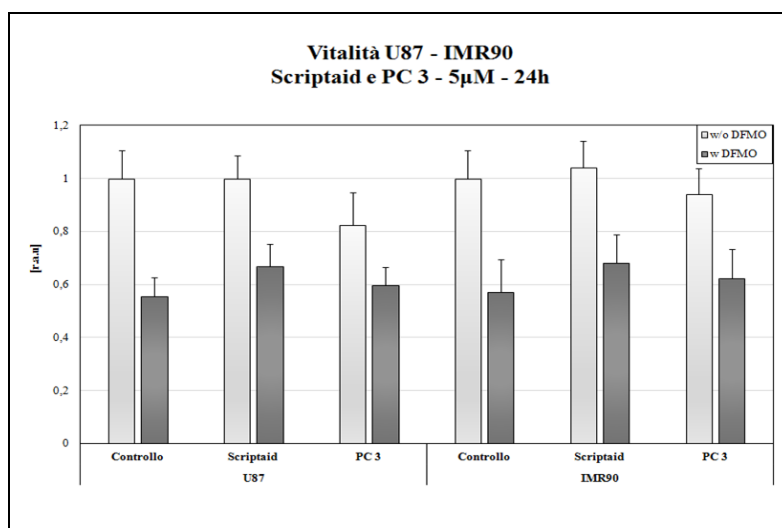


Figura 54: Vitalità cellulare testata a seguito del trattamento con Scriptaid e PC 3 in presenza o assenza di DFMO su entrambe le linee: U87 e IMR90.

10.2. Western Blotting linee cellulari U87 e IMR90

Per valutare nello specifico la selettività del farmaco PC 3 si è deciso di valutarne gli effetti di inibizione delle HDAC sia sulla linea sana sia su quella tumorale, indagando il livello di acetilazione istonica cellulare a seguito della somministrazione del farmaco d'interesse in

combinazione con il DFMO. I dati sono stati paragonati con la condizione di controllo e quella di trattamento con Scriptaid, che induce iperacetilazione istonica non selettiva. Per effettuare tali valutazioni, quindi, sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti di Western Blotting specifici per le forme acetilate degli istoni H3 e H4 nelle due linee cellulari U87 e IMR90. Un esempio rappresentativo dei risultati dei Western Blotting ottenuti è mostrato nelle Figure 55 (U87) e 56 (IMR90).

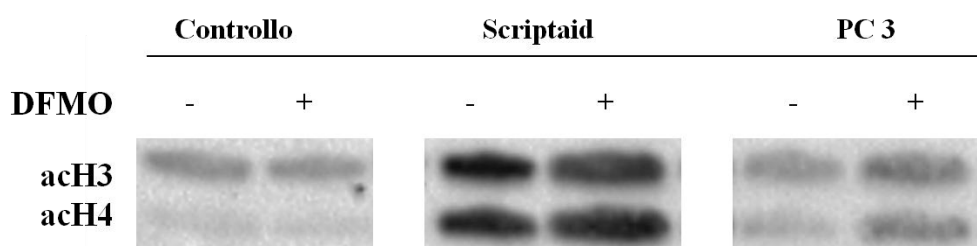


Figura 55: Linea U87: bande relative alle forme acetilate degli istoni H3 ed H4 nelle varie condizioni di trattamento (controllo, Scriptaid e PC 3 somministrati eventualmente in associazione a DFMO).

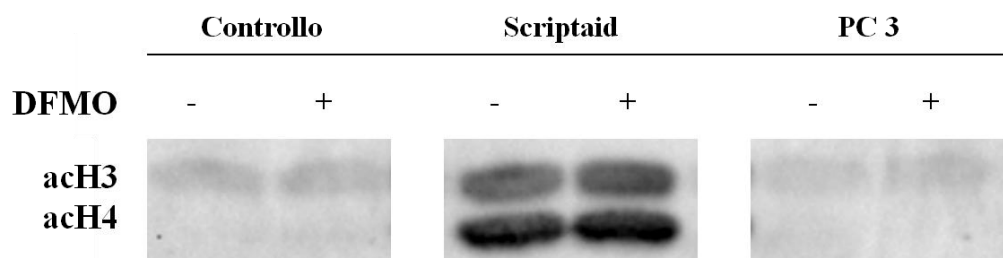


Figura 56: Linea IMR90: bande relative alle forme acetilate degli istoni H3 ed H4 nelle varie condizioni di trattamento (controllo, Scriptaid e PC 3 somministrati eventualmente in associazione a DFMO).

I risultati di densitometria ottica delle bande specifiche dell'acH3 ottenute da tre esperimenti indipendenti sono stati mediati tra loro e visualizzati nell'istogramma di figura 57, che riporta i valori medi con i relativi errori standard sulle medie. Un trend simile si evidenzia anche per quanto riguarda l'acetilazione dell'istone H4.

Come ci si aspettava lo Scriptaid risulta il farmaco con più alto potenziale inibitorio delle HDAC capace di indurre iperacetilazione istonica, sia usato singolarmente sia in

associazione a DFMO. L'effetto dello Scriptaid è evidente e paragonabile per entrambe le linee cellulari, a causa probabilmente del fatto che diffonde liberamente e in modo non selettivo in tutti i tipi cellulari.

Il composto PC 3 non determina invece un aumento significativo dell'acetilazione istonica in entrambe le linee cellulari, quando usato in assenza di cotrattamento con DFMO. Tuttavia buone caratteristiche di selettività di tale farmaco emergono se somministrato in associazione a DFMO: i livelli di acH3, rispetto alla situazione di controllo, risultano infatti incrementati in valor medio di circa 6 volte nella linea tumorale e solo 1.8 volte in quella sana.

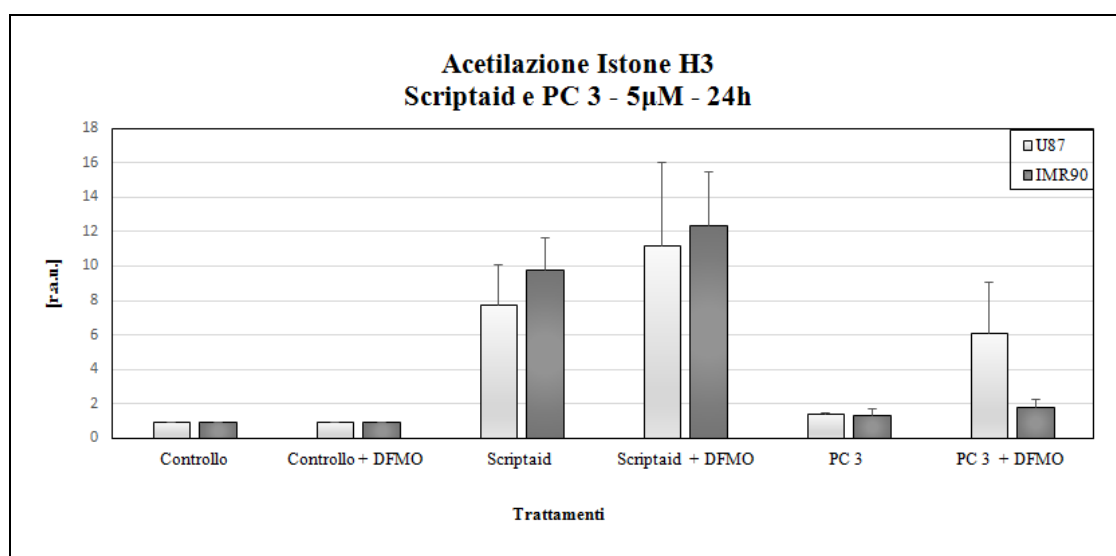


Figura 57: Istogramma relativo alla quantificazione della densitometria ottica delle bande specifiche per l'acH3 di tre esperimenti indipendenti di trattamento delle linee U87 e IMR90 con PC 3 e Scriptaid in presenza o assenza di DFMO.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

I risultati sperimentali riportati in questo lavoro di tesi sugli effetti dei nuovi composti poliamminici, testati in laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare “Silvio Cavalcanti”, suggeriscono un loro potenziale valore come nuovi inibitori delle HDAC, da utilizzarsi singolarmente o in combinazione con chemioterapici tradizionali come trattamenti farmacologici innovativi per le terapie antitumorali. L'apparente selettività per le cellule neoplastiche del composto risultato più efficace rende promettente l'approfondimento di questa linea di ricerca.

La coda poliamminica conferirebbe a questi composti vantaggiose proprietà: la carica positiva di tale coda policationica indirizzerebbe il farmaco direttamente verso il DNA, carico negativamente, aumentando l'efficacia della terapia e diminuendo gli effetti collaterali; la presenza di trasportatori poliamminici sovraespressi a livello delle cellule tumorali potrebbe portare ad assecondare l'ingresso dei farmaci poliamminici in cellula, permettendo una maggiore selettività nei confronti delle cellule neoplastiche rispetto quelle sane; modificando la coda policationica si potrebbe tentare di generare inibitori specifici per le diverse isoforme delle HDAC aumentando ancora una volta l'efficacia del farmaco e limitando la disregolazione dei meccanismi di acetilazione cellulare.

La cuore naftalenediimidico del farmaco, inoltre, per le sue proprietà di intercarsi nel DNA sembra riservare numerose potenzialità sia come agente antiproliferativo che come agente antitumorale [Tumiatti et al. 2009].

Infine, la vera e propria parte inibitoria delle HDAC dei composti poliamminici, l'acido idrossamico, aumenterebbe ampiamente le capacità antitumorali del farmaco per esempio incentivando l'apoptosi, o riprogrammando l'assetto epigenetico della cellula promuovendo la riaccensione di geni oncosoppressori silenziati.

Agendo, quindi, sulle modificazioni epigenetiche si potrebbero anche sensibilizzare maggiormente le cellule neoplastiche ai trattamenti chemioterapici.

In tale tesi di laurea si è posta particolarmente attenzione al ruolo dei nuovi coniugati poliamminici come potenziali inibitori delle HDAC indagando la loro efficacia, la loro interazione con l'inibitore enzimatico della sintesi di poliammine, il DFMO, e la selettività di uno in particolare di tali farmaci (PC 3) per le cellule tumorali.

I dati sperimentali presentati in tale tesi indicano che i nuovi farmaci testati comportano un'inibizione contenuta della crescita cellulare, valutata alle 24 ore di trattamento, se somministrati come agenti singoli, mentre in combinazione con il DFMO l'inibizione raggiunge livelli superiori al 50% a causa degli effetti citostatici di quest'ultimo, che prevale sugli effetti degli altri farmaci.

Analizzando l'acetilazione istonica indotta dal trattamento con i singoli composti poliamminici, sia il PC 3 che il PC 6 mostrano buone qualità come inibitori delle HDAC, ma solo nella condizione di cotrattamento con DFMO. Questo dato sperimentale sottolinea il fatto che il DFMO oltre a svolgere un ruolo fondamentale come farmaco citostatico, influenza i meccanismi cellulari, quali, la sintesi delle poliammine, svolgendo quindi un'azione sinergica con i farmaci poliamminici sopra citati. La maggior efficacia di tali molecole, infatti, potrebbe dipendere dal fatto che il DFMO, causando una deplezione delle poliammine cellulari, porta ad aumentare l'uptake delle poliammine dall'ambiente extracellulare, compresi i nuovi composti PC, che risultano quindi più efficaci perché presenti in concentrazione intracellulare più elevata.

Per verificare tale ipotesi occorre estrarre e dosare la concentrazione delle poliammine naturali e del composto PC 3 nelle cellule sottoposte alle varie condizioni di trattamento e determinare nello specifico se nella condizione di cotrattamento con DFMO effettivamente un maggior quantitativo di composto poliamminico sintetico sia entrato nelle cellule. Tale verifica effettuata su cellule tumorali U87 e sane IMR90 permetterebbe anche di confermarne la selettività per la linea neoplastica che presenterebbe quindi il sistema di trasporto delle poliammine più attivo.

Il composto PC 3 mostra un'inibizione della crescita cellulare alle 24 ore di trattamento di circa il 20% nelle cellule tumorali U87, invece non ha influenze sulla vitalità delle

cellule sane IMR90: risultato che avvalorava le potenziali proprietà selettive di questa molecola verso le cellule con il sistema di trasporto delle poliammine sovraregolato, come le cellule tumorali. Un'ulteriore evidenza sperimentale che sottolinea le importanti caratteristiche di selettività del PC 3 risulta dall'analisi dell'acetilazione istonica condotta su entrambe le linee cellulari analizzate. I dati di Western Blotting raccolti e riportati nel capitolo "Risultati e discussione" mostrano infatti una buona efficacia del composto PC 3 come inibitore delle HDAC se somministrato in presenza di DFMO nelle cellule tumorali ma non nella linea sana di fibroblasti.

I risultati ottenuti suggeriscono che le code poliamminiche svolgono un ruolo importante nel determinare la selettività dei farmaci e che il DFMO opera sinergicamente per accentuare tali caratteristiche. Il proseguimento dell'indagine dei meccanismi di azione di questi composti e la valutazione della loro selettività su un pannello di linee cellulari neoplastiche e sane più vasto sono indispensabili per avvalorare le potenzialità dei coniugati poliamminici nella terapia antitumorale. I risultati sperimentali preliminari ottenuti in questo lavoro di tesi pongono le basi per ulteriori indagini suggerendo la possibilità di sfruttare la coda poliamminica per direzionare selettivamente altre funzionalità come l'inibizione delle HDAC nelle cellule tumorali e per aumentarne l'efficacia.

APPENDICE

11. Protocolli

11.1. COMPLETAMENTO DEL DMEM

Occorre completare il terreno con 10% di siero, 1% di L-Glutammina (200mM) e 1% di antibiotici (Pen-Strept 10000 u/mL).

Per 500 mL di terreno completo:

- 440 mL terreno incompleto
- 50 mL siero fetale bovino (FBS)
- 5 mL L-Glutammina
- 5 mL antibiotici (penicillina e streptomicina)

Nota: Congelare le cellule in siero contenente il 10% di DMSO (che permette la formazione di cristalli che non distruggono le cellule) in criovials da 2mL. Trasferire le cellule a -80°C nell'apposito contenitore per il congelamento graduale contenente isopropanolo, preraffreddato a -80°C per almeno 4 ore. Dopo 2 giorni trasferirle nelle scatole.

11.2. PRAPARAZIONE DEL PBS

Per la preparazione di 1 L di PBS occorrono:

- KCl (2.7 mM) 0.20 g
- KH_2PO_4 (1.5 mM) 0.20 g

- **NaCl** (137mM) 8.00 g
- **Na₂HPO₄** (8.1mM) 1.15 g

Sciogliere i 4 componenti in 800 ml di acqua mQ, in un becker, utilizzando un'ancoretta magnetica su un agitatore magnetico. Misurare il pH (con il pH-metro e -se necessario- portarlo al valore di 7,4 mediante l'aggiunta di piccoli volumi di NaOH 5M o HCl 37% fumante). Trasferire la soluzione salina in un pallone tarato da 1 L e portare a volume con acqua mQ,. Autoclavare la soluzione e sterilizzare per filtrazione con un filtro con porosità di 0,22 mm. La soluzione salina si conserva a T.A.

11.3. TRIPSINIZZAZIONE

Riscaldare il terreno e la tripsina a 37°C per attivarla;

Nota: i volumi si intendono per piastre da 9 cm di diametro

- Aspirare il terreno vecchio;
- Aggiungere 3 mL PBS (2 mL piastra da 6 cm) facendo attenzione a pipettarlo su un lato della piastra per evitare di staccare le cellule;
- Aspirare il PBS eliminando i residui di terreno che contengono l'inibitore della tripsina;
- Aggiungere 1 mL (0.7 mL piastra da 6 cm) di tripsina e distribuirla uniformemente nella piastra;
- Incubare da 1 a 3-4 minuti a seconda della linea cellulare in incubatore a 37°C;
- Agitare e dare dei colpetti col dito sul lato della piastra per facilitare il distacco delle cellule;
- Aggiungere 2-3 mL (2 mL piastra da 6 cm) di terreno per bloccare l'azione della tripsina;
- Inclinare la piastra; aspirare le cellule e pipettarle lavando la piastra e trasferirle in una provetta (se necessario ripetere l'operazione con 1 mL di terreno);
- Centrifugare per 5 minuti a 800 rpm a t.a.;
- Eliminare il surnatante;
- Dare dei colpetti sul fondo della provetta per separare le cellule fra loro;

- Aggiungere la quantità di terreno utile per la diluizione desiderata e risospendere le cellule pipettando (es. per una diluizione 1:4 – riso spendere in 2 mL di terreno e seminarne 0.5 mL per piastra)
- Aggiungere 7.5 mL di terreno in nuove piastre e 0.5 mL di cellule;
- Distribuire le cellule;

11.4. TEST DI VITALITÀ

- Sotto cappa sterile e preparare una soluzione di AlamarBlue 10% in terreno avendo cura di limitare la luce all'interno della cappa (lampada spenta) perché la soluzione è fotosensibile;
- Aspirare il terreno dai pozzetti;
- Dispensare 100 μ L di soluzione di AlamarBlue 10% appena preparata in ogni pozzetto;
- Riporre la piastra multipozzetto in incubatore per almeno 2 ore (massimo 4);
- Accendere il PC per la lettura in fluorescenza e, solo successivamente, il lettore multipiastra Tecan 10 minuti prima della misura;
- Procedere con la lettura del segnale fluorescente nel lettore multipiastra;
- Selezionare dal programma a PC: il tipo di piastra (es. a fondo piatto e trasparente), se con o senza coperchio, i pozzetti che si desidera leggere, se la lettura deve essere effettuata dall'alto della piastra (top) o se dalla sua base (bottom), la lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione (rispettivamente 570 nm e 590 nm);
- Inserire la piastra multipozzetto nel cassetto apposito dello strumento;
- Dare l'avvio alla lettura.

11.5. WESTERN BLOTTING PER L'ANALISI DELL'ACETILAZIONE ISTONICA

Raccolta delle cellule

Preraffreddare la centrifuga 4°C in quanto le cellule andranno centrifugate a freddo per prevenire la degradazione delle proteine (vedi punto 5).

1. Inclinare le piastre su un lato e aspirare il terreno. Il tutto può essere svolto sfruttando il sistema di aspirazione da banco avendo cura di cambiare il puntale piastra per piastra. Aggiungere 3 mL di PBS sulla parete delle piastre e aspirarlo dopo aver lavato le piastre.
2. Aggiungere altri 3 mL di PBS e staccare le cellule in ghiaccio con l'aiuto di uno scraper. Da questo momento in poi le operazioni verranno svolte in ghiaccio.
3. Tenendo le piastre inclinate raccogliere le cellule in una provetta e lavare le piastre con altri 2-3 mL di PBS per raccogliere nelle provette tutte le cellule rimaste.
4. Centrifugare a 1500 rpm a 4°C per 5 minuti.
5. Eliminare il surnatante da ogni provetta.
6. Risospendere ogni pellet in circa 200 µL di PBS tenuto in ghiaccio completato con gli inibitori di proteasi PI stock 25X e AEBSF stock 100X (es. 1mL di PBS completato = 950 µL PBS + 40µL PI + 10 µL AEBSF) e trasferirli in conetti da 1.5mL precedentemente etichettati sia sul tappo che sul lato mediante caratteri semplici e concisi (in ordine: linea cellulare, tipologia di trattamento e data).
7. Centrifugare 5 min a 1500 rpm. Si consiglia di mantenere la parte fissa del tappo dei conetti rivolta verso l'esterno della centrifuga; in questo modo i pellet saranno più facili da maneggiare e trattare. Se non si pellettano bene dare anche una spinnata veloce con lo spin da banco e eliminare il surnatante. E' consigliabile usare le pipette a volume molto basso per evitare di aspirare le cellule.
8. Conservare i pellet di cellule a -80°C o procedere con l'estrazione delle proteine.

Per tutte queste operazioni appena viste si lavora in ghiaccio per prevenire la degradazione delle proteine: mantenervi sia le provette che i conetti per più tempo

possibile. N.B. Fino a che non si denaturano le proteine in SDS 4% (comprese quindi le proteasi cellulari) i campioni devono essere mantenuti in ghiaccio.

Estrazione delle proteine

1. Etichettare le colonnine di purificazione QIAshredder (Qiagen Cat. No. 79654) col nome dei vari campioni.
2. Scongellare i campioni.
3. Disgregare i pellet di cellule dando dei colpetti sul fondo dei conetti;
4. Risospendere ogni campione con circa 100 μL (anche 200 μL se le cellule fossero più di 3 milioni) in SDS 4% e trasferirlo in una colonnina QIAshredder (il lisato diventa molto viscoso quindi aiutarsi con la puntale per farlo scivolare nella colonnina se non si riesce ad aspirarlo).
5. Riposizionare le colonnine sui rispettivi conetti dei campioni appena trasferiti.
6. Centrifugare a 14 000 rpm per 2 minuti.
7. Eliminare la colonnina e procedere al dosaggio.

Dosaggio delle proteine (bicinchoninic acid - BCA - Assay)

Preriscaldare l'incubatore a 37°C per l'incubazione dei campioni da dosare (vedi punto 9). Per la bollitura dei campioni (vedi punto 13) posizionare un becker riempito di acqua distillata sulla piastra riscaldante, inserirvi la sonda di temperatura e settare lo strumento a 100°C e coprire con alluminio.

1. Preparare una soluzione di albumina (BSA) alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (es. pesare circa 10-20 mg di BSA e scioglierla in 10-20 mL di H₂O mQ nel rullo per evitare le bolle).
2. Accendere lo spettrofotometro e posizionare il filtro a 562 nm (in laboratorio si utilizza il filtro a 560 nm).
3. Etichettare le cuvette per la retta di calibrazione e per i campioni da dosare in doppio e 1 bianco.

4. Preparare una mix per un numero di campioni pari a n+1 di BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Cat. N. 23223) e di BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Cat. N. 23224) in percentuale 49:1 (es 49mL reagente A + 1mL reagente B). Coprire la provetta di stagnola perché fotosensibile.
5. Dispensare 1mL di mix in ogni cuvetta.
6. Aggiungere 2-4-8-16-24 μL di BSA nei campioni per la retta di calibrazione che corrisponderanno alle concentrazioni di 2-4-8-16-24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Porsi all'interfaccia del liquido per evitare imprecisioni dovute ad adesione per capillarità della BSA al puntale.
7. Aggiungere 2 μL di ogni campione. Porsi all'interfaccia del liquido per evitare imprecisioni dovute ad adesione per capillarità dei campioni al puntale.
8. Mixare con la pipetta p1000 avendo cura di cambiare puntale per ogni campione.
9. Incubare 30 min a 37°C al buio.
10. Procedere con la misurazione dell'assorbanza a 562 nm: porre la cuvetta del bianco, che rappresenta il riferimento, nello spettrofotometro e azzerare il valore di assorbanza misurato spingendo il tasto REF, quindi posizionare tutti i campioni e leggere l'assorbanza spingendo il tasto TEST.
11. Preparare un file excel dove fare le medie delle misurazioni fatte in doppio e riportare i valori dei campioni incogniti alla retta di calibrazione.
12. Preparare in conetti da 1.5mL safe lock delle diluzioni di campioni in modo che siano concentrati nel volume finale 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e aggiungere Laemmli Sample Buffer 4X + DTT 50mM (preparato in stock 1M).
Calcolare quanto Laemmli Sample Buffer 4X + DTT 50mM sono necessari: per esempio per avere 50 μL per campione servono 12.5 μL di Laemmli Sample Buffer 4X + DTT, quindi moltiplicare questo valore per il numero di campioni necessari + 2.
13. Chiudere i campioni con i tappi di sicurezza e porli in acqua bollente a 100°C per 3 min.
Per far questo:
14. Conservare i campioni a -20°C.

SDS-PAGE

Pur mantenendo, come tecnica analitica che permette l'analisi di estratti proteici, l' SDS-PAGE, nella corsa elettroforetica sfrutteremo gel pronti: Mini-PROTEAN® Precast Gels. In particolare ci atterremo alle condizioni di corsa e di preparazione indicati dal produttore. Per l' SDS-PAGE, sfrutteremo i Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gel i quali devono essere utilizzati mediante campioni trattati con il Sample Buffer Laemmli unito a β -mercaptoetanolo o DTT mentre come Running Buffer prevedono il Tris/glycine/SDS.

Corsa elettroforetica

1. Rimuovere il gel dal sacchetto di stoccaggio e prepararlo per il montaggio.
2. Rimuovere delicatamente il nastro verde nella parte inferiore del gel.
3. Posizionare la base dotata di elettrodi in posizione aperta (guarnizioni laterali verdi aperte) sopra una superficie pulita.
4. Posizionare il gel, sulla base appena appoggiata, avendo cura di porre la parte con il vetrino più basso rivolta verso l'interno. Una volta ancorato il gel mediante i "fermi" che si trovano nella parte bassa della base, il gel si troverà inclinato di un angolo di c.a. 30° rispetto l'asse della base stessa. Per far allineare il gel con quest'ultima applicare una pressione sufficiente per porlo in asse facendo attenzione a mantenere il gel ben ancorato alla parte bassa della base.
5. Nel caso si vogliano far correre due gel basterà ripetere il procedimento del punto 4 sulla medesima base ma dalla parte diametralmente opposta rispetto al primo gel già montato, di modo da creare una camera perfettamente funzionante. In caso contrario basterà sfruttare il "finto gel" presente nel kit e trattarlo, per il completamento della camera, come fosse un gel a tutti gli effetti.
6. Una volta fissati i gel chiudere la camera mediante le guarnizioni laterali verdi portandole verso l'alto.
7. Posizionare l'elemento così completato nel serbatoio (camera) per la corsa a nostra disposizione.

8. Riempire la camera interna dei gel con del Running Buffer* sino al limite per vedere se è a tenuta. In caso contrario si dovrà procedere alla sistemazione della camera di modo da risolvere il problema.
9. Riempire la camera esterna del sistema di corsa elettroforetica col Running Buffer* a seconda di quanti gel devono essere trattati. Si troveranno, infatti, delle tacchette relative all'utilizzo di 2 o 4 gel. Anche nel caso dell'utilizzo di un unico gel o di tre gel si dovrà riempire la camera esterna rispettivamente sino alle tacchette di 2 e 3 gel. Infatti in caso di un numero di gel dispari comunque è necessario utilizzare i vetrini forniti dal produttore di modo da completare la chiusura delle camere (è come se fossero effettivamente 2/4 gel).

*Per l'utilizzo del Running Buffer: Se sono presenti due tipi di Running Buffer, uno "usato" ed uno "nuovo" (dovuti ad esperimenti precedenti), versare quello "usato" nella camera esterna mentre il "nuovo" in quella interna.
10. Rimuovere con molta attenzione il pettine superiore per liberare i pozzetti che ospiteranno i campioni.
11. Caricare le quantità desiderate di proteine (es. 15 µg) e 5 µL di marcatore di peso molecolare (Mw). Fare attenzione alla portata massima dei pozzetti.
12. Chiudere la camera esterna con l'apposito coperchio che collegherà gli elettrodi al generatore di tensione.
13. Settare il generatore con i valori di tensione indicati, per le specifiche condizioni di lavoro, dal produttore:
 - 1 gel → settare il generatore su "constant voltage" al valore di c.a. 125 V. Da questo momento in poi modificare i valori di tensione nel tempo di modo da mantenere la corrente costante intorno a 25/30 mA. La corsa dovrebbe completarsi nell'arco di quaranta minuti c.a.
 - 2 gel → il generatore su "constant voltage" al valore di c.a. 150 V. Da questo momento in poi modificare i valori di tensione nel tempo di modo da mantenere la corrente costante intorno a 60/70 mA. La corsa dovrebbe completarsi nell'arco di quaranta minuti c.a.

Le condizioni appena riportate sono frutto dell'esperienza di laboratorio unita alle raccomandazioni del produttore. Per correttezza si riportano anche le condizioni che si possono ritrovare nei libretti illustrativi degli strumenti:

Condizioni di corsa per tutti i tipi di gel: 300 V costanti per i quali si avrà una corrente iniziale di 55/75 mA mentre una corrente finale di 45/70 mA. (Moltiplicare il valore delle correnti per il numero di gel utilizzati).

Tempo di corsa per tutti i tipi di gel: 15/20 minuti.

Estrazione ed attivazione del gel

1. Una volta terminata la corsa, eliminare il Running Buffer della camera interna. Quello della camera esterna porlo in una vaschetta per facilitare lo smontaggio del gel.
2. Smontare il gel dalla sua base e riporlo nella vaschetta col Running Buffer. Porre la piccola leva fornita dai produttori tra i due vetrini contenenti il gel a livello delle frecce indicate. Effettuare così pressione verso l'esterno per separare i due vetrini.
3. Solo dopo essersi assicurati che i due vetrini, tra i quali si trova il gel d'interesse, siano completamente separati tra loro, procedere con l'estrazione del gel.
4. Attuare una piccola incisione in un angolo sul gel mediante il bisturi per identificare e non dimenticare l'orientamento della corsa e dei trattamenti.
5. Procedere con l'attivazione delle proteine al ChemiDoc™ MP Imaging System con il sistema stain-free:
 - Aprire il cassetto dello strumento.
 - Idratarlo con una piccola quantità di acqua mQ per evitare che il gel aderisca troppo alla piastra .
 - Riporre il gel nel cassetto e chiuderlo.
 - Aprire "Image Lab" sul pc collegato allo strumento.
 - Selezionare "New single file".
 - Scegliere (sulla parte sinistra della schermata): Acquisition Settings → Gel Imaging
 - Selezionare poi, in Application, Select → Protein Gel → Stein Free Gel

- Selezionare poi, in Gel Activation, Gel used in Blotting (1 min)
- Selezionare poi, in Select Gel Type, Bio-Rad Mini-PROTEAN Gel (intense band)
- Procedere con “Position”: ci consente di settare lo zoom e centrare il gel nell’immagine;
- Una volta posizionato il gel, selezionare Run Protocol. Il sistema genererà l’immagine di tutte le proteine posizionate in bande a seconda del loro peso molecolare. Tutto ciò serve per valutare la qualità della corsa e per attivare le proteine in modo da renderle visibili anche dopo averle trasferite su nitrocellulosa;
- Salvare l’immagine.

Trasferimento su nitrocellulosa o PVDF (Blotting)

1. Una volta attivato il gel, riporlo nel Running Buffer e procedere con il Blotting.
2. Nel frattempo filtrare il Running Buffer della vaschetta in una bottiglia etichettata con “Running Buffer USATO” con data e conservarlo in frigorifero.
3. Aprire le confezioni di nitrocellulosa già pronte per il blotting.
4. Aprire e portare sul banco da lavoro uno dei due cassettei del sistema di trasferimento TurboBlot.
5. Porre il “bottom(+)” del sandwich (compreso di nitrocellulosa) sulla base del cassetto appena sistemato sul banco. Passare il rullo per eliminare le bolle.
6. Posizionarvi sopra il gel.
7. Porre il “Top(-)” del sandwich sopra il gel per completare. Passare il rullo per eliminare le bolle.
8. Riporre il cassetto, dopo averlo chiuso, nello strumento apposito.
9. Avviare il trasferimento seguendo le condizioni indicate dai produttori:

- Per un solo mini- gel nel cassetto settare lo strumento con
corrente: 1.3 A
voltaggio: 25 V
tempo: 6 min.
 - Per due mini-gel o per un midi-gel nel cassetto settare lo strumento con
corrente: 2,5 A
voltaggio: 25 V
tempo: 6 min
10. Una volta terminato il trasferimento, estrarre la nitrocellulosa avendo cura di mantenere la parte con le proteine rivolta verso l'alto.
 11. Attuare una piccola incisione in un angolo senza danneggiarla con l'aiuto di forbici per ricordarsi dell'orientamento delle proteine e dei trattamenti.
 12. Immergere la nitrocellulosa in TBS-TWEEN 20 0.05%.
 13. Visualizzare le proteine trasferite al ChemiDoc™ MP Imaging System tramite il sistema stain.-free: Aprire perciò sul pc Image Lab:
 - New single file
 - Gel imaging
 - Select → Blots → Stein free Blot
 - Select type gel → Bio-Rad Mini-PROTEAN Gel (intense band)
 - Position
 - Running protocol
 - Salvare l'immagine
 14. Immergere nuovamente la nitro in TBS-TWEEN 20 0.05% avendo cura di mantenere il lato con le proteine rivolto verso l'alto.

Immunoblotting

Incubazione con gli anticorpi e rilevazione del segnale chemiluminescente

1. Preparare una soluzione di latte al 5% in TBS-tween 20 0.05% (es 2.5 g in 50 mL) in una falcon da 50 mL.
2. Incubare la membrana per 1 ora in movimento in latte 5% TBS-tween 20 0.05% (va bene anche O/N a 4°C).
3. Conservare il latte utilizzato a 4°C.
4. Preparare la soluzione con l'anticorpo primario 1µL/1mL (1:1000) per acH3, acH4 e GAPDH, in latte 5% TBS-tween 20 0.05%: per un'incubazione della membrana nella provetta nel rullo preparare circa 5 mL di soluzione (idratare precedentemente la provetta da 50mL e porvi la nitro con le proteine rivolte verso l'interno), circa 10 mL invece nel caso della vaschetta nell'agitatore orbitale.
5. Incubare la membrana con l'anticorpo primario per 1 ora in agitazione a r.t. (va bene anche O/N a 4°C).
6. Lavare la membrana con TBS-tween 20 0.05%.
7. Procedere quindi con altri 3 lavaggi in agitazione vivace per 3 min in TBS-tween 20 0.05%.
8. Preparare la soluzione con l'anticorpo secondario 1µL/2.5mL (1:2500) in latte 5% TBS-tween 20 0.05%: per un'incubazione della membrana nella provetta nel rullo preparare circa 5 mL di soluzione, circa 10 mL invece nel caso della vaschetta nell'agitatore orbitale.
9. Incubare la membrana con l'anticorpo secondario per 30 min in agitazione a r.t.
10. Lavare la membrana con TBS-tween 20 0.05%.
11. Procedere quindi con altri 3 lavaggi in agitazione vivace per 3 min in TBS-tween 20 0.5%.
12. Conservare la membrana a 4°C o procedere con la rivelazione del segnale chemiluminescente.
13. Preparare una mix 1:1 di luminolo e acqua ossigenata (reagente a e b del kit Bio-Rad). Per una nitro considerare circa 1,4 mL di soluzione totale.
14. Asciugare la nitro e porla su un vetrino.

15. Aggiungere la mix e spargerla sulla nitro, agitando per 1 min.
16. Asciugare la nitro e procedere con la rilevazione del segnale al ChemiDoc™ MP

Imaging System:

- Blots → High Sensivity Blot
- Select gel type → Bio-Rad Mini-PROTEAN Gel
- Position
- Running protocol (salvare un'immagine ogni 5 sec per 1 min per esempio)
- Salvare l'immagine.

Questo serve per rilevare il dato utile per la quantificazione delle proteine.

- Blots → Colorimetric
- Select gel type → Bio-Rad Mini-PROTEAN Gel
- Position
- Running Protocol
- Salvare l'immagine.

Questo serve per ottenere un immagine in campo chiaro per la visualizzazione del marker di peso molecolare.

11.6. PREPARAZIONE DEL TBS – TWEEN 20 0.05%

Stock 10X TBS

Tris (base) (100mM) 12.11 gr

NaCl (1.5M) 87.60 gr

ddH₂O fino a 1 L (pH ~8)

Si conserva a RT.

Diluzione finale di lavoro 1X

Stock 10X 100ml

Tween 20 500 µl

ddH₂O fino a 1 L

Si conserva a RT.

BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecolare della cellula*. IV edizione, Zanichelli 2004.

Baylin SB, Jones PA. The fundamental role of epigenetic events in cancer 2002; 419.

Baylin SB. DNA Methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clinical Prac* 2005; 2(1):S4-S11.

Bernstein BE, Meissner A and Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007; 128, 669-681.

Campbell-Reece. *Biologia (Parte I: La chimica della vita)*, Pearson 2009; 79-82:84:85:87-90:101-105.

Cheong JW, Chong SY, Kim JY, Eom JI, Jeung HK, Maeng HY, Lee ST, Min YH. Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:5018 –27.

Esteller M and Villar-Garea A. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of Anticancer agents 2004; 171-176.

Esteller M, Fraga MF, Ballestar E, Paz M, Ropero S, Setien F, Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins 2005; PNAS 10604-10609.

Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set

produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003;2:151– 63.

Hobbs CA, Paul BA, Gilmour SK, Elevated levels of polyamines alter chromatin in murine skin and tumors without global changes in nucleosome acetylation, 2003.

Järvinen A, Grigorenko N, Khomutov AR, Hyvönen MT, Uimari A, Vepsäläinen J, Sinervirta R, Keinänen TA, Vujcic S, Alhonen L, Porter CW, Jänne J Metabolic stability of alpha-methylated polyamine derivatives and their use as substitutes for the natural polyamines, 2004.

Jones PA and Baylin SB. *The Epigenomics of Cancer*. *Cell* 2007; 128:683-692.

Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. Histone Deacetylation in Epigenetics: An Attractive Target for Anticancer Therapy 2005; 265:272:274.

Nelson DL, Cox MM. *Introduzione alla biochimica di Lehninger*. IV edizione, Zanichelli 2011; 361:362.

Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. *Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs* 2013.

Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P, Pegg AE (1992) Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J Biol Chem* 267:150–158.

Senanayake MDT, H Amunugama, Boncher TD, Casero RA, Woster PM 2009; 77-90.

Silverthorn DU. *Fisiologia umana, un approccio integrato*; Quarta edizione, 2012, Pearson; 81:82.

Tumiatti V, Milelli A, Minarini A, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted naphthalene imides and diimides as anticancer agent. *J Med Chem.* 2009 Dec 10;52(23):7873-7. doi: 10.1021/jm901131m.

Varghese S, Gupta D, Baran T, Jiemjit A, Gore SD, Casero RA, Woster PM 2005; 6350:6351.

Wu Y, Steinbergs N, Murray-Stewart T, Marton LJ, Casero RA 2012; 693.

SITOGRAFIA

[1] <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCgQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.smf.n.unical.it%2Ffiles%2Fcdl%2Fsbiologiche%2F5617ColtureEsercitazioni2008.doc&ei=GFrtUpOtJqqCyAPeq4CwCw&usg=AFQjCNFQp789IVa6LBtrDCGqd9SvRPVBkw&bvm=bv.60444564,d.bGQ>

[2] <http://www.federica.unina.it/scienze-biotechnologiche/biotechnologie-cellulari-e-molecolari/vitalita-e-proliferazione-di-cellule-in-cultura/>

[3] <https://www.wikipedia.org/>

[4] <http://medicinacultura.files.wordpress.com/2010/05/medicina-lezioni-di-biochimica-applicata-ebook-med-ita.pdf>

[5] <http://farmacia.unich.it/biochim/didattica/pdf/farm/NewBioApp/2%20%20colture%20cellulari.pdf>

[6] <http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/glioblastoma.html>

[7] http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.biotechnologie.univaq.it%2Fgetres.php%3Fresid%3D2802&ei=6jb9Ur7CKOiVywOWgYGACA&usg=AFQjCNE_TgpaDuHIIfE1hbJLC0bHt-HQ0VA&bvm=bv.61190604,d.bGQ

[8] http://amsdottorato.unibo.it/1577/1/cetrullo_silvia_tesi.pdf

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamenti infiniti vanno ai miei familiari che in tutti questi anni hanno saputo starmi a fianco ed essere “il conforto” nei momenti più duri, “la risolutezza” nei momenti giusti, “la comprensione e la critica” più sincere in ogni momento della mia vita. Una dimostrazione d’affetto ed orgoglio immensi, per tutti questi motivi, va a loro che sono e resteranno per sempre un punto di riferimento ed un modello da seguire. Li ringrazio perché mi hanno insegnato a affrontare tutto a testa alta, ad accettare anche i momenti più tristi e soprattutto che per essere una famiglia basta ed avanza rispettarci e volersi bene. Grazie di cuore!

Un ringraziamento particolare va a mio fratello, con il quale ho condiviso gioie e dolori da sempre e che stimo profondamente. E’ stato e sarà sempre un modello d’ispirazione e di calma nell’affrontare le situazioni anche nei momenti più duri. Grazie per esserci!

Un ringraziamento in particolare va a Stefano che è riuscito a farmi ridere, a sopportarmi e a credere in me in ogni singolo istante della mia vita in tutti questi anni. Lo ringrazio per essere stato ed essere tutt’ora il miglior “compagno di viaggio” che possa desiderare.

Un ringraziamento particolare va anche a Claudio, Giuliana, Silvia che nonostante mi abbiano visto poco, soprattutto ultimamente, hanno saputo dimostrarmi un affetto immenso e una presenza costante. Vi ringrazierò sempre di questo.

Un ringraziamento formidabile va ai miei amici, dai più stretti ai conoscenti, che hanno contribuito a fare di questi tre anni di università i più belli della mia vita. Ora posso comprendere a pieno la frase che più e più volte ho sentito dire: “gli anni universitari sono i più belli”. Lo confermo e lo sottoscrivo pienamente e se lo faccio lo devo a tutti voi che

mi avete saputo comprendere, sopportare e soprattutto accettare per quello che sono. Vi voglio bene!

Ringrazio, inoltre, profondamente Alice per avermi seguito ed essere stata “onnipresente” in questo mio percorso formativo di tesi, per essere stata un’ottima “insegnante” e per aver condiviso le risate più belle senza mai perdere la propria professionalità. Un grazie di cuore!!

Un caloroso ringraziamento va anche a Lucia ed agli altri ragazzi del laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare “Silvio Cavalcanti” grazie ai quali questi sei mesi di tesi sono passati senza farsi sentire.

Un ultimo ma non meno importante ringraziamento va al professore Emanuele Giordano, per me grande esempio di un ottimo connubio di umanità e professionalità. Lo ringrazio in particolare per avermi sempre dimostrato grande disponibilità in questi mesi.