

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e
Sperimentali
Settore disciplinare BIO10
Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Applicate alle Scienze
Mediche (XXIII ciclo)



INDUZIONE SELETTIVA DI MORTE CELLULARE PER
CATASTROFE MITOTICA IN CELLULE TUMORALI:
EFFETTI DELLA PURINA SINTETICA REVERSINA

Relatore: Chiar.ma Prof. ssa Paola VIANI

Correlatore: Chiar.mo Prof. Luigi ANASTASIA

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Enrico GINELLI

Marco PICCOLI

Anno Accademico: 2009/2010

INDICE

- **CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE**

- 1.1 La Reversina
- 1.2 Il ciclo cellulare
- 1.3 La morte cellulare

- **CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI**

- **CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI**

- 3.1 Colture cellulari
- 3.2 Curve di crescita
- 3.3 Analisi dell'attivazione di pathway apoptotici
- 3.4 Analisi del ciclo cellulare in citofluorimetria a flusso
- 3.5 Analisi dell'espressione genica
- 3.6 Immunofluorescenza
- 3.7 Analisi citogenetica

- **CAPITOLO 4 – RISULTATI**

- 4.1 Effetti del trattamento con reversina sulla morfologia cellulare
- 4.2 Valutazione della proliferazione e della vitalità cellulare dopo trattamento con reversina
- 4.3 Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso
- 4.4 Studio del meccanismo di morte cellulare indotto dal trattamento con reversina
- 4.5 Analisi citogenetica del contenuto dei cromosomi dopo trattamento con reversina
- 4.6 Analisi degli effetti della reversina su fibroblasti umani dopo deregolazione del pathway di p53
- 4.7 Effetti della reversina su culture primarie di cellule staminali tumorali di glioblastoma

- **CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

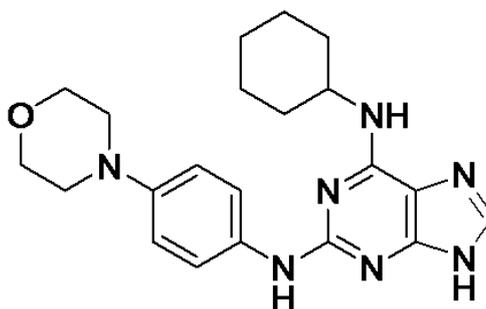
- **BIBLIOGRAFIA**

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE

1.1 LA REVERSINA

La conoscenza di animali e organi dotati di capacità rigenerativa ha suscitato un crescente interesse verso la comprensione dei meccanismi molecolari alla base del de-differenziamento cellulare (1). Negli ultimi anni, infatti, è stato dimostrato che cellule *terminalmente* differenziate possono essere indotte a de-differenziarsi a cellule praticamente indistinguibili dalle cellule staminali embrionali (2). Questo processo di riprogrammazione è stato inizialmente indotto attraverso l'espressione forzata di alcuni specifici geni, definiti "master genes", tra cui KLF4, Sox2, Oct3/4 e c-Myc, in fibroblasti embrionali di topo, e le cellule così generate sono state chiamate *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) (2). Successivamente, risultati simili sono stati ottenuti anche su fibroblasti umani di derma utilizzando gli stessi quattro fattori (3-5) o in combinazione con altri fattori, tra cui Nanog e Lin28 (6). Nonostante le iPSCs abbiano aperto una nuova era nella ricerca sulle cellule staminali, diverse sono le problematiche che ancora ne ostacolano un effettivo impiego nella terapia clinica, tra cui l'utilizzo di vettori lentivirali per indurre l'espressione dei fattori necessari al meccanismo di riprogrammazione (7). Negli ultimi anni, sono stati riportati numerosi approcci sperimentali per superare questo problema, tra cui quello di riprogrammare le cellule con molecole di sintesi in grado di mimare gli effetti dell'overespressione genica. Sono state così studiate proteine ricombinanti (8) o piccole molecole di sintesi (9, 10) in grado di stimolare la riprogrammazione cellulare senza modificare il corredo genetico della cellula originaria. In particolare, lo screening di librerie di composti eterociclici capaci di interagire con protein-chinasi ha permesso di evidenziare le potenzialità di un analogo purinico disostituito in posizione 2 e 6, la 2-4 (morfolinoanilino)-6-cicloesilaminopurina, chiamata in seguito semplicemente reversina (Figura 1.1) (10).

[FIGURA 1.1](#) Struttura molecolare della reversina (Cheng S. et al, *JACS* 2004, 126, 410-411)



2-(4-morfolinoanilino)-6-cicloesilaminopurina

Peter Schultz e collaboratori hanno valutato gli effetti de-differenzianti di questa molecola utilizzando la linea di mioblasti murini C2C12, cellule “committed” per il differenziamento muscolare, in grado di fondere e formare miotubi in opportune condizioni di coltura. Dopo quattro giorni di trattamento con reversina, notevoli differenze morfologiche sono state osservate nelle cellule trattate rispetto a quelle utilizzate come controllo ed inoltre, mentre le cellule di controllo differenziavano formando miotubi multinucleati, le cellule trattate con reversina non differenziavano mostrando la perdita dell’espressione di alcuni dei marker caratteristici del processo di miogenesi tra cui miogenina e MyoD. Successivamente, per dimostrare che la reversina fosse in grado effettivamente di de-differenziare le cellule e di farne riacquistare la multipotenza, le cellule C2C12, pre-trattate con la molecola, sono state indotte a differenziare verso fenotipi cellulari diversi, come l’osteogenico e l’adiposo, utilizzando le opportune condizioni di differenziamento in vitro (10). Al termine del trattamento è stato osservato che, rispettivamente, il 35% e il 40% delle cellule avevano assunto il fenotipo desiderato, risultando positive alla valutazione dei marker tipici utilizzati per identificare osteoblasti e adipociti. Il solo trattamento con reversina, in assenza degli stimoli adeguati, non è stato in grado di trasformare le cellule muscolari in cellule di altri tessuti, evidenziando l’assenza di proprietà trans-differenzianti della molecola e

sottolineandone quelle de-differenzianti (10). Più recentemente, è stato anche dimostrato che mioblasti murini trattati con concentrazioni sub-micromolari di reversina erano in grado, sottoposti ad opportuni stimoli, di esprimere marcatori specifici del lineage neuroectodermico e di differenziare a cellule neuronali (11).

È noto però che le cellule C2C12, qualora opportunamente stimolate, siano in grado di differenziare spontaneamente in osteoblasti e adipociti. Per dimostrare le effettive potenzialità della reversina, sono state quindi utilizzate altre linee cellulari. In particolare, è stato osservato che il trattamento di fibroblasti murini esprimenti la green fluorescent protein (GFP) con questa molecola, determinava una marcata inibizione della proliferazione cellulare, pari all'80% dopo quattro giorni di trattamento, accompagnata da importanti modificazioni morfologiche, ma senza causare danni cellulari irreversibili e alterazione della vitalità cellulare (12). Inoltre, mediante un'analisi in citofluorimetria a flusso, è stata osservata la formazione di una popolazione tetraploide con contenuto di DNA $\geq 4N$, a causa probabilmente di un'errata citochinesi, come già osservato in precedenza dal gruppo di Schultz. È importante sottolineare come tutti questi effetti siano risultati reversibili, dal momento che la sospensione del trattamento con reversina e il ripristino delle normali condizioni di coltura hanno permesso alle cellule di riacquistare il loro fenotipo originale e un normale tasso di crescita (12). In seguito è stato dimostrato come la reversina sia in grado di de-differenziare anche colture primarie di fibroblasti umani e murini che, una volta posti in coltura a contatto con mioblasti murini (C2C12), sono indotti a differenziare in muscolo scheletrico con elevata efficienza sia in vitro che in vivo. L'utilizzo di co-colture di fibroblasti umani con C2C12 mediante trans-well ha permesso di dimostrare che il processo non fosse dovuto alla fusione tra i due tipi cellulari a stretto contatto, ma a un vero e proprio trans-differenziamento delle cellule

umane. Inoltre, ulteriori esperimenti hanno evidenziato la capacità di fibroblasti trattati con reversina di differenziare in altri tipi cellulari come osteoblasti e cellule muscolari lisce.

Questi risultati suggeriscono come la reversina abbia la capacità di aumentare la plasticità delle cellule trattate, così che stimoli successivi, quali possano essere le interazioni cellula-cellula o opportuni terreni di coltura, siano in grado di attivare i meccanismi specifici di differenziamento cellulare (12). Risultati simili sono stati ottenuti molto recentemente anche utilizzando cellule fibroblastoidi ottenute dagli anelli intervertebrali di ratto. Infatti, trattando queste cellule con diverse concentrazioni nanomolari di reversina, è stato possibile de-differenziarle e in seguito indurne il differenziamento in cellule osteogeniche, adipose e condrocitarie (13). Inoltre, la reversina è stata utilizzata in esperimenti di trasferimento nucleare da cellula somatica (SCNT) per testare se fosse in grado di migliorare la riprogrammazione del nucleo della cellula donatrice. I risultati hanno dimostrato che la frequenza di formazione della blastocisti era molto più elevata negli embrioni pre-trattati con la molecola rispetto a quelli utilizzati come controllo, sottolineando ancora una volta le potenzialità de-differenzianti della reversina (14).

Nonostante siano molte le prove degli effetti della reversina su cellule di origini differenti, il meccanismo d'azione della molecola non è stato ancora completamente chiarito. Lo stesso gruppo di ricercatori che ha descritto l'azione de-differenziante della reversina, ha in seguito cercato di identificare i processi molecolari alla base di questa attività. Sono stati così identificati due bersagli principali della molecola, la miosina non muscolare di tipo II (NMMII) e la protein-chinasi MEK1. La miosina non muscolare è una proteina del citoscheletro che svolge un ruolo fondamentale nella citocinesi, infatti, inibitori di NMMII, come BTS e la blebbistatina, causano il blocco della citocinesi e

l'arresto della cellula nella fase G2/M del ciclo cellulare. MEK1 è una proteina della famiglia delle MAP-chinasi e, in particolare, ha un ruolo nel pathway che conduce alla fosforilazione di ERK; la via del segnale MEK1-ERK è coinvolta nel controllo di molti processi cellulari tra cui proliferazione, differenziamento e controllo della morte cellulare. Diverse sono le evidenze sperimentali che mostrano come la reversina agisca da doppio inibitore della miosina non muscolare di tipo II e della protein chinasi MEK1 (15). Nello stesso studio è stato dimostrato, utilizzando diversi approcci, che inibendo contemporaneamente sia la NMMII che MEK1 si ottenevano effetti analoghi a quelli osservati dopo trattamento con reversina (15). E' stato quindi ipotizzato che l'inibizione della miosina non muscolare di tipo II sia responsabile dell'accumulo delle cellule osservato nella fase G2/M del ciclo cellulare, mentre l'inibizione di MEK1 porti alla modulazione dell'acetilazione dell'istone H3 con un possibile effetto di modulazione dell'espressione genica e della plasticità cellulare. Inoltre, un ruolo essenziale per l'azione della reversina lo svolge anche la fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) ma il meccanismo dettagliato deve essere ancora investigato (15).

Recentemente, mediante studi di cristallografia, è stata dimostrata la presenza d'interazioni tra la reversina e alcuni membri della famiglia delle aurora chinasi. Sembra che la reversina si leghi al sito di legame per l'ATP e agisca da inibitore competitivo (16). Le aurora chinasi appartengono ad una famiglia di serin/treonin chinasi altamente conservata durante l'evoluzione. La loro funzione principale è quella di promuovere la formazione del fuso mitotico attraverso la regolazione dei centrosomi e svolgono un ruolo importante nella regolazione della mitosi nelle cellule eucariotiche (16). In particolare, la reversina ha come bersaglio preferenziale l'aurora chinasi B, che tra le altre funzioni, media la fosforilazione dell'istone H3. L'ipotesi proposta in questo studio, è che gli effetti de-differenzianti associati alla reversina siano dovuti ai

cambiamenti della fosforilazione dell'istone H3 con conseguente rimodellamento cromatinico (17).

Infine, un'analisi proteomica delle cellule trattate con reversina ha mostrato che la molecola induce un aumento dell'espressione dei geni del polycomb responsive complex 1 (PHCI) e della polycomb metiltransferasi (Ezh-2), entrambi coinvolti nel processo di silenziamento genico. In questo modo la reversina bloccherebbe l'espressione dei geni specifici delle cellule terminalmente differenziate riportandole ad uno stato pluripotente (18).

Questi risultati, quindi, suggeriscono che gli effetti della reversina sul ciclo e sulla divisione cellulare e sulle modificazioni degli istoni e dell'espressione genica possano contribuire all'aumento della plasticità cellulare.

1.1.1 EFFETTI DELLA REVERSINA SU CELLULE TUMORALI

La reversina è stata scoperta grazie a uno screening di molecole in grado di interagire con le protein-chinasi. Il ruolo di queste proteine nel controllo del ciclo cellulare è noto ed ha suggerito di studiare gli effetti della reversina sulla proliferazione maligna delle cellule tumorali (19). Questi studi sono stati effettuati su diverse linee cellulari tumorali quali PC-3, HeLa, CWR22Rv1 e DU-145. I risultati hanno dimostrato come la reversina sia in grado di inibire la proliferazione tumorale già a concentrazioni sub-micromolari con una relazione dose-risposta direttamente proporzionale. Parallelamente, la molecola determina un accumulo di cellule poliploidi con un contenuto di DNA $\geq 4N$. In particolare, nelle cellule PC-3 si osserva, come conseguenza del trattamento, la formazione di nuclei plurilobati e un aumento anche pari a 100 volte delle dimensioni cellulari rispetto alle cellule epiteliali prostatiche normali utilizzate come controllo. L'aumento delle dimensioni cellulari è in relazione sia con la dose sia

con il tempo del trattamento con la molecola. Il culmine degli effetti si ottiene dopo quattro giorni dall'inizio del trattamento con reversina alla concentrazione 1 μM e due giorni dopo con reversina alla concentrazione 5 μM .

L'osservazione di questi effetti dopo il trattamento con la molecola ha permesso di ipotizzare un ruolo modulatorio della reversina nell'espressione di proteine regolatorie delle varie fasi del ciclo cellulare, tra cui le cicline (19). Investigando il ruolo di p21^{WAF/CIP1} in questo processo, è stato così rilevato un aumento della sua espressione, e ciò ha permesso di ipotizzare che l'aumento di questa proteina, unitamente al modesto incremento dell'espressione della ciclina D3 e di CDK6 e alla riduzione dell'espressione della ciclina B1 e di CDK1, sia sufficientemente elevato da promuovere il rientro delle cellule nella fase G1/S senza che la mitosi sia completa, generando così endoreplicazione e cellule poliploidi. Il meccanismo proposto prevede un aumento della velocità di degradazione del complesso CDK1/ciclina B1, contemporaneamente all'up-regolazione di p21^{WAF/CIP1} che promuove l'uscita prematura delle cellule dalla mitosi e il loro rientro nella fase G1. Le cellule sono così reindirizzate verso la fase S di replicazione del DNA senza che sia avvenuta nessuna divisione cellulare (19).

Recentemente, come menzionato in precedenza, è stata dimostrata l'esistenza di un'interazione tra la reversina e le aurora chinasi. Queste proteine sono spesso over-esprese in diversi tumori e le loro mutazioni o la loro inibizione può portare a difetti nel corretto funzionamento dei centrosomi durante la mitosi, con conseguente disallineamento dei cromatidi fratelli, malformazione del fuso mitotico, difficoltà nella citocinesi ed eventualmente arresto della mitosi stessa. La famiglia delle aurora chinasi è formata da tre membri: aurora A, B e C (16).

L'aurora A è la proteina più studiata. Viene anche chiamata chinasi "polare" perché risiede ai poli del fuso mitotico durante la mitosi ed è implicata nel controllo della duplicazione, nella maturazione e nella separazione dei centrosomi. La sua assenza porta al blocco del ciclo cellulare e la sua attività è regolata dallo stato di fosforilazione del residuo di treonina T288; quando questo residuo viene defosforilato dalla fosfatasi 1 o 2A la proteina è inattiva, al contrario, quando è fosforilata, si associa a TPX2, una proteina associata ai microtubuli e li orienta nella giusta direzione per formare correttamente il fuso mitotico (16).

L'aurora B è un componente catalitico del chromosomal passenger complex insieme ad altri cofattori tra cui la survivina. Durante la mitosi è coinvolta in diversi processi tra cui la condensazione cromatinica, l'attacco del cinetocore ai microtubuli, la segregazione dei cromatidi, la citocinesi e la regolazione del checkpoint del fuso mitotico. L'aurora B è chiamata anche chinasi "equatoriale", è localizzata sul centromero nei primi stadi della mitosi dove, tramite la fosforilazione della serina 10 dell'istone H3, facilita la condensazione della cromatina. Durante la profase-metafase, l'aurora B promuove l'adeguata localizzazione delle proteine centromeriche assicurando il legame con il fuso mitotico bipolare. Inoltre, questa proteina, durante l'anafase, è in grado di identificare l'assenza della tensione bipolare e distrugge l'aggancio dei cromosomi al fuso mitotico. Questo porta all'attivazione del checkpoint del fuso prevenendo la formazione di divisioni cellulari aberranti con conseguente aneuploidia. Una volta completata la separazione dei cromatidi, l'aurora B migra verso la zona centrale del fuso mitotico dove, durante la citocinesi, facilita la corretta funzione dell'anello contrattile di actinmiosina. La sua inibizione determina, infatti, l'uscita prematura della cellula dalla mitosi senza che la citocinesi sia stata completata e il

ripetersi di questi eventi determina poliploidia con formazione di grandi cellule multinucleate (20).

L'aurora chinasi C è il membro meno noto della famiglia e, a differenza dell'aurora A e B è espressa nelle cellule germinali ma non in altri tessuti e in linee cellulari tumorali. Recenti studi hanno dimostrato che ha una distribuzione mitotica simile a quella dell'aurora B e quindi si suppone che anche il suo ruolo sia simile, se non ridondante, a quello dell'aurora chinasi B (20).

Le aurora chinasi sono così diventate un interessante target per farmaci anti-tumorali. Gli inibitori delle aurora chinasi, come VX-680, sono una nuova classe di piccole molecole recentemente entrata nei trial clinici per la cura contro il cancro e similmente alla reversina, essi inducono poliploidia e inibizione della citocinesi. La reversina sembra sia in grado di inibire preferenzialmente l'aurora chinasi B, che a sua volta inibisce la fosforilazione dell'istone H3, che è noto essere un bersaglio di questo stesso enzima (16). La iper-fosforilazione di questo istone è infatti associata ad instabilità cromosomica e all'aumento dell'invasività tumorale (20). Da questi risultati e considerando le funzioni fisiologiche dell'aurora B, è stato supposto che l'accumulo di cellule 4N, osservato dopo trattamento con reversina, non sia dovuto a un arresto pre-mitotico ma sia il risultato dell'inibizione della citocinesi, causato dalla mancata maturazione e formazione del fuso mitotico per alterazioni a carico dei centrosomi. Si deduce che la reversina possa possedere un forte effetto antitumorale e, a differenza degli altri inibitori delle aurora chinasi, sembra essere caratterizzata da alta selettività per le cellule maligne con una buona tollerabilità per le cellule sane (16). Inoltre l'azione antitumorale della reversina potrebbe essere mediata anche dall'induzione del differenziamento cellulare perché è stato dimostrato che il trattamento con la molecola induce l'espressione di alcuni markers differenziativi specifici. In particolare, essa

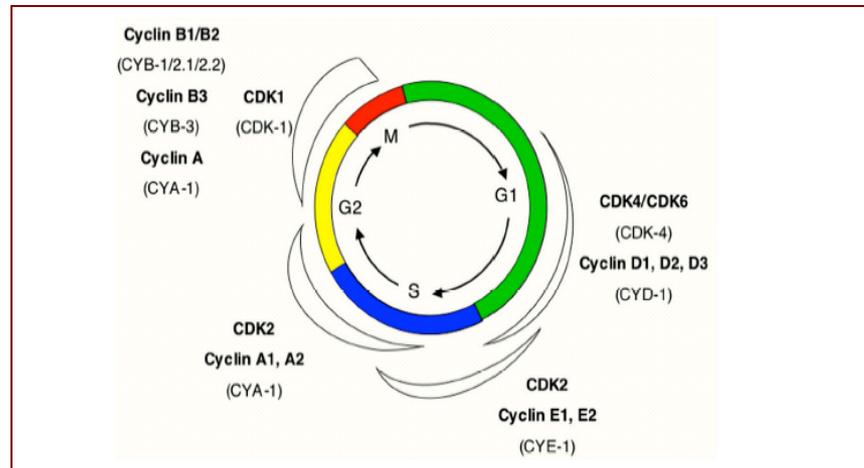
promuove l'espressione di reelina, un marker selettivo del differenziamento neuronale espresso dai neuroni GABAergici nella linea di carcinoma embrionale umano N TERA-2 (NT2), e di CD11b, marker di differenziamento, nella linea leucemica HL60 (16). L'ipotesi corrente è, quindi, che la reversina possa avere molteplici effetti diversi, tra cui il più marcato è sicuramente l'induzione del de-differenziamento cellulare, in base al tipo di cellula su cui agisce. Inoltre, ulteriori studi potranno chiarirne più approfonditamente il meccanismo d'azione e validarne l'utilizzo come farmaco anti-tumorale.

1.2 IL CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare comprende una sequenza ordinata di fasi successive denominate fase G1, fase S o replicativa durante la quale il DNA viene accuratamente duplicato, fase G2 e fase M o mitosi. In seguito a stimoli esterni o interni le cellule possono uscire dal ciclo replicativo e assumere uno stato di quiescenza denominato fase G0 (21). In media la durata del ciclo cellulare è di circa 24 ore ma può variare in base al potenziale proliferativo del tipo cellulare preso in considerazione.

La progressione ordinata della cellula attraverso il ciclo cellulare è guidata dall'attivazione e dall'inattivazione delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdk), che regolano la transizione tra le fasi successive del ciclo cellulare. Le Cdk sono piccole serina/treonina protein chinasi che richiedono l'associazione in complesso con una ciclina per essere attivate. La regolazione delle Cdk dipende dalla controllata espressione e distruzione delle cicline, dal loro stato di fosforilazione/defosforilazione e dalla loro associazione con proteine inibitorie (Figura 1.2) (21).

FIGURA 1.2 La regolazione del ciclo cellulare (van den Heuvel S. *Wormbook* 2005, 1-16)



Tra le Cdk, Cdk1 e Cdk4/6 sono essenziali per la progressione nel ciclo cellulare. Cdk1 è specificatamente richiesta per la transizione fase G2/fase M e agisce in combinazione con le cicline A e B. La ciclina B viene sintetizzata nella tarda fase S e raggiunge il livello massimo in metafase. Il complesso ciclina B-Cdk1, in associazione al complesso ciclina A-Cdk1, induce e regola tutti gli eventi della mitosi fino all'inizio dell'anafase.

Cdk4/6 si associa con la ciclina D1 controllando e promuovendo l'entrata e la progressione attraverso la fase G1. In particolare, il complesso ciclina D1-Cdk4/6 fosforila la proteina pRb, permettendo il rilascio del fattore trascrizionale E2F e il superamento del checkpoint della fase G1 (restriction point R). Bassi livelli della ciclina D1 sono così responsabili dell'ingresso delle cellule nella fase quiescente G0.

La ciclina E, insieme alla ciclina D, è responsabile della transizione delle cellule dalla fase G1 alla fase replicativa S. Essa, infatti, si associa a Cdk2 e questo complesso (ciclina E-Cdk2) permette la progressione nella fase G1 e l'ingresso delle cellule in fase S. Inoltre, la Cdk2 è in grado di legarsi alla ciclina A stimolando l'inizio della replicazione del DNA (21).

La fine regolazione del ciclo cellulare è mediata anche da una serie di meccanismi d'inibizione delle chinasi ciclina-dipendenti. Tra questi, svolgono un ruolo essenziale le proteine Cdk inibitorie (CdkI), che si dividono in due classi: la prima classe, denominata anche "inhibitor of Cdk" o INK, comprende le proteine p16^{INK4A}, p15, p18 e p19 che sono specifiche per Cdk4 e Cdk6 e ne inibiscono il legame alle cicline D; la seconda classe include le proteine p21^{WAF/CIP1}, p27 e p57 che sono inibitori generali delle Cdk, ma sono in grado di bloccare specificatamente l'attività chinasi di Cdk4 e Cdk2. In particolare, la proteina p16^{INK4A} determina il blocco del ciclo cellulare in fase G1, prima del punto di restrizione R, andando a inibire l'attività del complesso ciclina D1-Cdk4/6. I livelli della proteina p16^{INK4A} impongono la soglia dei livelli di espressione della ciclina D necessari per la fosforilazione della proteina pRb. La proteina p21^{WAF/CIP1} e la proteina p27 svolgono invece la loro funzione controllando la transizione G1/S, a valle del punto R e facilitando l'entrata nel nucleo dei complessi ciclina D-Cdk (22-23).

Inoltre, un ruolo fondamentale nel controllo del ciclo cellulare è svolto da diversi checkpoint, essenziali per la corretta duplicazione del DNA e per la divisione cellulare e le chinasi dei checkpoint Chk1 e Chk2 sono enzimi chiave in questa regolazione.

Il primo punto di controllo è rappresentato dal checkpoint in fase G1: questo checkpoint ha lo scopo di monitorare le condizioni cellulari sia metaboliche che ambientali per definire se la cellula è in grado di proseguire nel ciclo cellulare per raggiungere la fase S di sintesi del proprio DNA.

Una volta superato il punto di restrizione R della fase G1, la cellula viene controllata dal checkpoint G1/S, la cui funzione è quella di verificare che il corredo genetico sia corretto e che non esistano rotture a livello dei filamenti del DNA, ad esempio come quelle indotte dalle radiazioni ionizzanti, prima che la cellula entri nella

fase S e replichi il suo DNA. In presenza di danno al DNA, diverse cascate del segnale prevengono la replicazione del DNA danneggiato. Una di queste è la rapida degradazione della fosfatasi Cdc25A la cui attività è necessaria per la transizione fase G1/S. Chk1 attivata fosforila Cdc25A favorendone l'ubiquitinizzazione e la degradazione proteasoma-mediata. Il mantenimento di questo blocco è dovuto all'attivazione trascrizionale di p53 (24). Il checkpoint della fase G2 ha la funzione di controllare l'integrità del DNA dopo la replicazione e previene l'ingresso in mitosi delle cellule danneggiate mediante l'inibizione del complesso ciclina B-Cdc2 tramite Chk1 oppure mediante la degradazione e l'inibizione della famiglia delle fosfatasi Cdc25 tramite p38. Inoltre, in questa fase possono intervenire i meccanismi di riparo degli errori avvenuti durante la replicazione del DNA (24).

Infine, il checkpoint mitotico controlla il corretto assemblamento del macchinario mitotico, la formazione del fuso e il legame dei cromosomi ai microtubuli. Questo checkpoint inibisce l'attività ubiquitin-ligasica del complesso APC/C in grado di promuovere l'anafase. Il controllo in questa fase del ciclo cellulare è fondamentale per assicurare una bilanciata segregazione dei cromosomi e, di conseguenza, per generare due cellule figlie che contengano la giusta informazione genetica (25).

La proteina del retinoblastoma o più semplicemente pRb è stata uno dei primi onco-soppressori scoperti e gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della progressione nel ciclo cellulare. È noto che pRb è in grado di interagire con numerose proteine appartenenti a diversi processi cellulari, tuttavia, è ora chiaro che la maggior parte dei fattori in grado di interagire con pRb sia coinvolta nel controllo trascrizionale. Uno di questi, ed anche il suo target principale, è il fattore trascrizionale E2F, uno dei regolatori centrali dell'espressione dei geni del ciclo cellulare. La proteina pRb attenua l'attività di E2F reclutando co-repressori trascrizionali sui promotori regolati da E2F

causando così una riduzione dell'espressione dei geni E2F regolati. L'attività di pRb è regolata da eventi di fosforilazione che dipendono dalla posizione delle cellule nel ciclo cellulare e dalla presenza di stimoli mitogeni. Nelle cellule quiescenti in fase G0 e all'inizio della fase G1 la proteina pRb è ipofosforilata, in questo stato essa è attiva e sequestra il fattore E2F bloccandone completamente l'attività. In presenza di stimoli mitogeni, quali fattori di crescita, avviene una graduale fosforilazione di pRb che rende progressivamente meno efficiente la capacità di legare i suoi bersagli tra cui anche il fattore E2F. La fosforilazione di pRb è mediata dall'attività di due complessi Cdk-ciclina, in particolare da ciclina D-Cdk4/6 e ciclina E-Cdk2 che catalizzano la sufficiente fosforilazione di pRb per permettere la completa inattivazione della sua attività di repressione trascrizionale.

Inoltre, la proteina pRb è mantenuta iperfosforilata durante tutta la durata dell'interfase, suggerendo che l'attività del fattore trascrizionale E2F è necessaria per permettere la continua progressione dalla fase G1, attraverso la fase S e G2 fino all'ingresso delle cellule in mitosi. Diverse chinasi partecipano a questo processo, tra cui i complessi ciclina A-Cdk2 e ciclina B-Cdk1. Infine, durante la transizione in mitosi, una fosfatasi riporta pRb allo stato originale ipofosforilato riattivandolo e impedendo così alla cellula di rientrare nel ciclo cellulare (26).

Un altro fattore chiave nella regolazione del ciclo cellulare è la proteina p53. In risposta a stimoli di stress, la proteina p53, che normalmente ha bassi livelli di espressione, si accumula all'interno delle cellule mediante un aumento della sua stabilità (28). La fosforilazione della serina 15 mediata da ATM o ATR e della serina 20 mediata da Chk1 infatti inibisce il trasporto della proteina dal nucleo al citoplasma causandone così l'accumulo e un aumento dell'attività. I livelli di p53 sono anche regolati dal grado di ubiquitinizzazione tramite l'ubiquitin-ligasi Mdm2. Inoltre, ATM è

in grado di fosforilare anche Mdm2 bloccando la sua interazione con p53 e provocando così il suo accumulo (24). La proteina p53 integra i segnali provenienti da una serie di stimoli diversi. Le risposte cellulari indotte da questa proteina sono così diverse e possono includere l'arresto del ciclo cellulare, l'induzione di senescenza, apoptosi o differenziamento e il riparo del DNA (27-28). La maggior parte di queste risposte cellulari dipendono dalla capacità di p53 di agire da fattore trascrizionale. Questa proteina media l'inibizione della crescita cellulare inducendo l'espressione di p21, 14-3-3s, Cdc25C e GADD45, stimola il riparo del DNA sostenendo l'espressione di p21, GADD45 e la proteina dello xeroderma pigmentoso p48, induce l'apoptosi up-regolando la trascrizione di Bax, PUMA, Noxa, p53-AIP, PIG3, Fas/APO1/CD95 e KILLER/DR5. Bassi livelli di stress o il danno al DNA inducono livelli di p53 in grado di provocare l'arresto della crescita cellulare. Al contrario, in condizioni di severo stress cellulare, gli alti livelli di espressione e stabilità di p53 attivano la morte cellulare. È stato anche proposto che il tipo di attività di p53 sia mediato da specifiche modificazioni post-traduzionali. Inoltre, è stato dimostrato come p53 abbia un ruolo nel pathway apoptotico mitocondriale che è largamente indipendente dalla sua regolazione di tipo trascrizionale (28).

Il target trascrizionale preferito di p53 è la proteina p21^{WAF/CIP1} che inibisce l'attività del complesso ciclina E-Cdk2 causando il blocco della transizione fase G1/fase S. p21 si lega anche al complesso ciclina D-Cdk4 prevenendo la fosforilazione di pRb e sopprimendo così il pathway pRb/E2F (24). Quindi, p53, tramite l'espressione di p21, provoca l'arresto della cellula in fase G1 o in fase G2. Recentemente, è stato dimostrato che p53 è in grado di attivare anche la senescenza cellulare e di impedire la formazione di aneuploidie bloccando l'endoreplicazione di cellule tetraploidi che derivano da mitosi fallimentari. Infine, p53 può interagire direttamente con le proteine coinvolte nella

riparazione del DNA e con strutture specifiche del DNA stesso (27-28). In conclusione, la proteina p53 rappresenta un sensore della normale progressione del ciclo cellulare determinandone il blocco in caso di malfunzionamento, per consentire il ripristino della normalità. Per questo motivo p53 è stata definita “guardiano del genoma” (28).

Un altro importante regolatore del ciclo cellulare è il checkpoint mitotico che garantisce il controllo della correttezza della mitosi, ritardando la segregazione cromosomica o anafase finché tutti i cromosomi non si siano perfettamente attaccati al fuso mitotico. Questo meccanismo è dotato di alta sensibilità per cui anche un singolo cromosoma non disposto correttamente è in grado di attivare il checkpoint (29). Lo schema di base di questo checkpoint prevede un bilancio tra un segnale inibitorio che previene l’anafase e l’attività di un macchinario in grado di promuoverla. Il punto chiave di produzione del segnale inibitorio è il cinetocore, un complesso proteico che si assembla in prossimità del centromero dei cromosomi mitotici. Il cinetocore non legato agisce da scaffold catalitico per la generazione del segnale inibitorio. Quando la cellula entra in mitosi, tutti i cinetocori sono distaccati e generano un segnale che ferma la progressione dell’anafase. Il legame dei cromosomi al fuso mitotico blocca questo segnale inibitorio con la conseguente promozione dell’anafase (29) ([Figura 1.3](#)).

L’origine della progressione dell’anafase deriva dall’attività di una E3 ubiquitin-ligasi, chiamata anche complesso promotore dell’anafase-ciclosoma (APC/C), un complesso multiproteico che si associa al proteasoma. L’attività del complesso APC/C richiede uno specifico fattore, CDC20 (cell-division cycle 20 homologue), che riconosce e interagisce con specifici substrati mitotici. Tra i targets che sono degradati dal complesso sono inclusi la ciclina B1 e la securina (30). La degradazione della securina determina l’attivazione della separasi che taglia il legame tra i cromatidi fratelli, mentre la degradazione della ciclina B1 causa l’inattivazione della Cdk1 e

l'inizio dell'uscita dalla mitosi. La degradazione proteolitica è controllata dal checkpoint mitotico che previene l'entrata prematura della cellula nell'anafase. Il checkpoint attivato recluta delle proteine che inibiscono il riconoscimento della ciclina B e della securina ad APC/C da parte del CDC20, prevenendo così la progressione della mitosi. Esperimenti fatti da Rieder e colleghi mostrano che in una cellula un singolo cinetocore non attaccato determina un ritardo nell'anafase di almeno 3 ore (29-30).

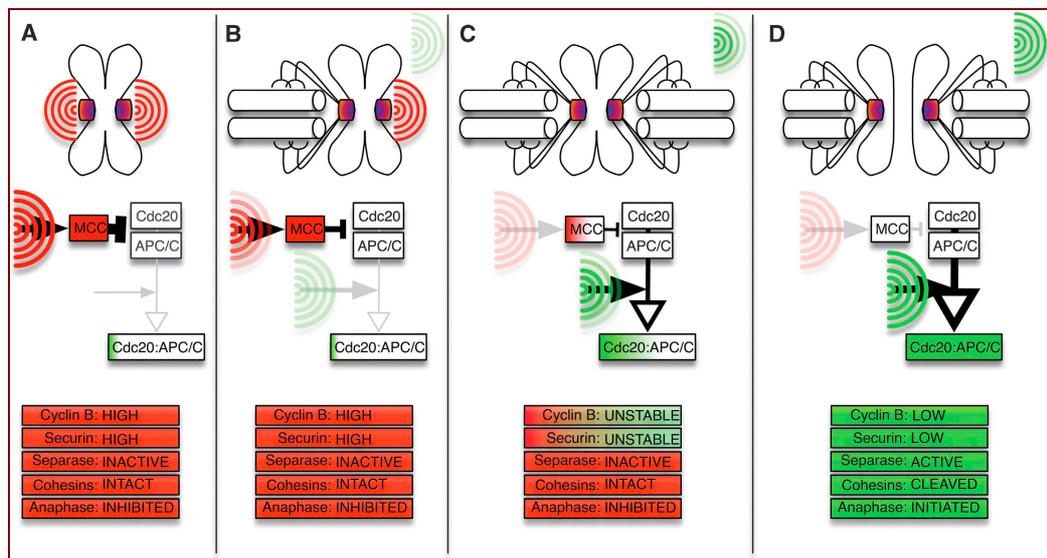


FIGURA 1.3: Schema del pathway del checkpoint mitotico (Ciliberto A et al, *EMBO Journal* 2009, 28, 2162-2173)

Il checkpoint mitotico è composto da tre complessi principali: la piattaforma di segnale localizzata in prossimità del cinetocore, il macchinario di attacco dei cromosomi al fuso mitotico e le attività citoplasmatiche associate all'azione del complesso APC/C. L'assemblaggio del cinetocore è un processo complesso che coinvolge molte proteine. All'inizio della prometafase, le proteine coinvolte vengono reclutate attorno al cinetocore non attaccato e tra queste sono comprese Mad1, Mad2, Mps1, Bub1, Bub3, BubR1, Aurora B, CENP-E ecc. Dettagliati studi strutturali hanno dimostrato come il primo step nella formazione di questo complesso inibitorio è

l'attivazione conformazionale di Mad2. Questa modificazione permette il legame con Cdc20 con la formazione del complesso Mad2-Cdc20 che è incapace di attivare APC/C. Il complesso del checkpoint mitotico (MCC) completo include anche BubR1 e Bub3 che lega il complesso al cinetocore o nel citoplasma. È MCC che effettivamente agisce per inibire l'attività del complesso APC/C.

Il cinetocore, oltre che a generare il segnale del checkpoint mitotico, svolge un ruolo fondamentale per catturare e stabilizzare i microtubuli del fuso mitotico che verranno usati per il trasporto dei cromatidi fratelli nelle cellule figlie. I componenti molecolari coinvolti in questo processo sono numerosi ma è stata dimostrata l'esistenza di un'interfaccia tra i componenti di legame ai microtubuli e i componenti del checkpoint mitotico del cinetocore. I candidati chiave per questo tipo di interazione sono le proteine Ndc80 e il complesso Rod-Zw10-Zwilch (RZZ). Ndc80 fa parte del cinetocore e permette il legame ai microtubuli. La sua completa assenza provoca la perdita del checkpoint mitotico. Il complesso RZZ è presente sul cinetocore e forma il sito di aggancio per la dineina che, una volta reclutata, interagisce con i microtubuli. Una volta che questa interazione è stabilita, la parte dello scaffold catalitico che lega Mdm2 viene trasportata verso i poli del fuso mitotico da parte del complesso dineina-RZZ. Questa attività è essenziale per eliminare l'inibizione dell'anafase una volta che tutti i cinetocori sono legati correttamente. Nonostante il cinetocore svolga un ruolo maggioritario nel controllo delle dinamiche del checkpoint mitotico, una parte di questa attività è anche dovuta alle interazioni citoplasmatiche di questi complessi. Il complesso MCC è infatti formato in prossimità del cinetocore ma la sua diffusione nel citoplasma è necessaria per l'inibizione di APC/C. Il legame di MCC con BubR1-Bub3 permette la formazione del complesso inibitorio MCC-APC/C che agisce da pseudo-substrato inibendo il reclutamento dei targets dell'anafase da parte di Cdc20 (29). Inoltre

l'attivazione del MCC inibisce l'ubiquitinizzazione della securina, che a sua volta blocca la separasi, la proteasi responsabile del taglio dei cromatidi fratelli, e della ciclina B. Questa inibizione provoca la mancata progressione dell'anafase e l'arresto della mitosi (30).

Quando il cinetocore è invece correttamente legato ai cromosomi e ai microtubuli, i microtubuli stessi generano una tensione che allontana Bub1 da BubR1-Bub3 provocando il rilascio di Mad2 che a sua volta, tramite il legame con p31/CMT2, non è più in grado di legare Cdc20 permettendo l'attivazione del complesso APC/C. Il complesso APC/C-Cdc20 attivo sostiene l'ubiquitinizzazione di securina e ciclina B stimolando la progressione dell'anafase e la conclusione della divisione cellulare (29-30).

1.2.1 MUTAZIONI DEI CHECKPOINT ASSOCIATE ALLA TUMORIGENESI

Le cellule tumorali sono caratterizzate da diverse mutazioni o alterazioni delle proteine regolatorie che inducono il mancato funzionamento dei checkpoint di controllo e quindi permettono a queste cellule di replicarsi e dividersi in modo anomalo e non bilanciato. La più comune caratteristica dei tumori solidi è l'aneuploidia e sono frequenti anche le mutazioni di oncogeni o dei geni soppressori tumorali come KRAS, p53, pRb, PTEN, APC, BRCA1 e altri. Nel caso di p53 e pRb, la presenza di mutazioni può condurre all'inattivazione dei checkpoint del ciclo cellulare con conseguenti ripercussioni sulla proliferazione, sulla divisione e sulla trasformazione tumorale. Una delle possibili cause dell'insorgere dell'aneuploidia è l'esistenza di mutazioni ricorrenti a carico di alcune delle proteine del checkpoint mitotico tra cui CEMP-E, Mad1, Mad2, Bub1, BubR1 e tutte e tre le componenti del complesso RZZ.

Il checkpoint mitotico può essere deregolato anche come conseguenza dell'inattivazione di geni oncosoppressori, in particolare per la perdita di APC, p53, BRCA1 o BRCA2, o per l'attivazione di oncogeni quali Mdm2, Aurora chinasi A, Ras, c-myc e le proteine E6 ed E7 del papilloma virus. Il risultato di questa inattivazione è la formazione di cellule aneuploidi o l'insorgere di instabilità cromosomica (CIN). Molte proteine soppressori tumorali controllano i livelli d'espressione di alcuni geni del checkpoint mitotico a livello trascrizionale. L'espressione di Mad2, per esempio, dipende dal legame da parte del fattore trascrizionale E2F. Cellule Rb negative, infatti, esprimono alti livelli del fattore trascrizionale E2F e in esse si osserva un numero di cellule poliploidi fino a dieci volte maggiore della norma. È stato quindi ipotizzato che una parte della popolazione cellulare possa adattarsi al checkpoint iperattivo (indotto dall'aumento di Mad2) ed entrare nel ciclo cellulare successivo come una cellula poliploide. Questo può poi causare una distribuzione sbilanciata dei cromosomi e di conseguenza portare alla CIN (30). Anche la proteina p53 regola trascrizionalmente l'espressione di alcuni componenti del checkpoint mitotico ma la sua attività in questo senso non è ancora stata completamente chiarita (30).

1.3 LA MORTE CELLULARE

La morte cellulare programmata (PCD) è uno dei principali componenti del normale sviluppo, del mantenimento dell'omeostasi e dell'eliminazione delle cellule danneggiate negli organismi uni- e multicellulari (31). I meccanismi di morte cellulare possono essere classificati in base alle caratteristiche morfologiche, a criteri enzimatici (coinvolgimento o esclusione di nucleasi e caspasi), ad aspetti funzionali o caratteristiche immunologiche (32). Le cellule che stanno andando incontro a morte sono coinvolte in un processo che è reversibile fino al raggiungimento di una fase

irreversibile e finché il “punto di non ritorno” è stato superato. È stato proposto che questo punto possa essere rappresentato dall’attivazione massiva delle caspasi, dalla perdita del potenziale elettrico di membrana, dalla completa permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna o dall’esposizione della fosfatidilserina (PS) sulla membrana cellulare esterna che rappresenta un segnale per la fagocitosi della cellula target da parte delle cellule adiacenti. In realtà, esistono diversi esempi in cui, nonostante la presenza di queste caratteristiche, la cellula non procede nel pathway di morte cellulare.

I meccanismi di morte cellulare più conosciuti e maggiormente descritti in letteratura sono essenzialmente due: l’apoptosi e la necrosi. In realtà, esistono altri pathway di morte cellulare con caratteristiche peculiari e differenti rispetto a quelli citati in precedenza. (33). Questi meccanismi possono essere caspasi-indipendenti e sono necessari per proteggere l’organismo da cellule potenzialmente dannose. Infatti, tali pathway possono essere innescati quando le vie che culminano nell’attivazione delle caspasi falliscono, ad esempio per la presenza di mutazioni inattivanti nei geni effettori dell’apoptosi, oppure possono essere attivati specificamente in risposta ad agenti citotossici o a particolari segnali di morte.

1.3.1 L’APOPTOSI

L’apoptosi è un particolare fenomeno di morte cellulare regolata da un preciso programma genetico e ha notevole importanza in numerosi processi biologici. Infatti, in condizioni fisiologiche svolge un ruolo fondamentale durante lo sviluppo embrionale, nel mantenimento dell’omeostasi nei tessuti e nei fenomeni che regolano l’invecchiamento, in condizioni patologiche invece, la sua de regolazione può portare a sviluppo di tumori, malattie autoimmuni o patologie degenerative (31). Sebbene le

caratteristiche morfologiche del processo di apoptosi siano note, la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano questo fenomeno è complessa (34). Una cellula in apoptosi mostra evidenti caratteristiche morfologiche individuabili principalmente al microscopio ottico o elettronico. La cellula assume una forma sferica perdendo il contatto con le cellule adiacenti e retraendo gli pseudopodi. Questo fenomeno è dovuto alla degradazione e digestione delle proteine del citoscheletro da parte di specifiche cisteinil-aspartato proteasi, chiamate caspasi, che si attivano all'interno della cellula stessa (35). Altra caratteristica morfologica peculiare dell'apoptosi è la condensazione cromatinica dovuta alla degradazione del DNA per opera di una specifica nucleasi, la cui attività produce caratteristici frammenti nucleici lunghi circa 200 paia di basi (picnosi). Inoltre, durante il processo apoptotico la cellula va incontro a frammentazione nucleare (carioressi), riduzione del volume cellulare e poche o assenti modificazioni degli organelli citoplasmatici. La membrana plasmatica, integra fino agli stadi finali del processo, mediante un meccanismo denominato blebbing, causa la divisione della cellula in più vescicole, chiamate corpi apoptotici, che vengono in seguito fagocitati dai fagociti residenti nei tessuti (32). La pronta fagocitosi delle cellule morte è responsabile dell'assenza di reazione infiammatoria associata all'apoptosi perché non vi è rilascio nei tessuti circostanti da parte delle cellule stesse del proprio materiale citoplasmatico e produzione di citochine infiammatorie (31).

I messaggi pro-apoptotici possono avere origine all'interno della cellula (intrinseci) o provenire dall'ambiente circostante (estrinseci). Essi costituiscono la risposta cellulare agli stress, come la mancanza di nutrienti, l'ipossia, lo stress ossidativo o il danno esteso al DNA. Entrambi i pathways apoptotici sono interconnessi con altre proteine di segnale come NF- κ B e p53-MDM2 e convergono a livello delle caspasi.

Tali enzimi rappresentano il cuore del “macchinario” apoptotico. L’apoptosi è un processo accuratamente controllato da una cascata di eventi molecolari energia dipendenti. Le caspasi sono enzimi conservati evolutivamente e sono espresse nella maggior parte delle cellule in forma inattiva. Quando attivate dal taglio proteolitico esse attivano altre pro-caspasi, amplificando così il segnale apoptotico che porta alla morte cellulare. Sono state identificate 14 caspasi diverse, 11 delle quali sono presenti nei mammiferi (31).

Queste proteasi sono state classificate in tre gruppi, in base alla loro sequenza bersaglio e al loro ruolo fisiologico:

- Gruppo 1 o caspasi pro-infiammatorie: comprende le caspasi 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14. Sono coinvolte in processi infiammatori e apoptotici e sono specifiche per la sequenza Trp-Glu-Hist-Asp.
- Gruppo 2 o caspasi iniziatrici dell’apoptosi: comprende le caspasi 2, 8, 9 e 10. Sono responsabili dell’inizio del processo apoptotico con specificità per sequenze X-Glu-Hist-Asp/ X-Glu-Thr-Asp.
- Gruppo 3 o caspasi effettrici dell’apoptosi: comprende le caspasi 3, 6, 7 e CED-3-simili. Sono direttamente responsabile della degradazione cellulare e della realizzazione del processo apoptotico. Sono specifiche per sequenze Asp-Glu-X-Asp.

Le caspasi in condizioni basali si trovano sotto forma di zimogeni, con bassa attività biologica. L’attivazione avviene in conseguenza al taglio proteolitico della pro-caspasi. Le caspasi sono modulate da diversi fattori cellulari endogeni tra cui le proteine inibitrici dell’apoptosi (IAP). Queste proteine hanno un dominio amino-terminale comune chiamato BIR (baculovirus inhibitor repeat) che sembra essere responsabile del legame inibitorio con le caspasi. Anche le proteine IAP sono modulate da fattori

cellulari endogeni, quando una cellula riceve uno stimolo apoptotico, l'attività delle IAP è inibita dal rilascio nel citosol di alcune proteine mitocondriali come Smac/DIABLO (Secondo Attivatore Mitocondriale delle Caspasi) e Omi/HtrA2. L'apoptosi è un meccanismo che richiede la presenza di energia disponibile per cui una cellula danneggiata in maniera eccessiva non è in grado di completare l'intero processo apoptotico e andrà incontro a morte cellulare mediante meccanismi differenti tra cui la necrosi (35).

1.3.1.1 LE VIE APOPTOTICHE

Esistono differenti sottotipi di morte cellulare per apoptosi che, nonostante condividano caratteristiche morfologiche simili, possano essere indotti da molteplici stimoli sia intra-sia extra-cellulari. La via estrinseca prevede la stimolazione dei recettori di morte transmembrana da parte di segnali provenienti dall'ambiente esterno, la via intrinseca è invece attivata da stimoli intracitoplasmatici e prevede il coinvolgimento dei mitocondri.

- VIA ESTRINSECA

La via estrinseca è attivata dalla stimolazione dei recettori di morte presenti sulla membrana plasmatica. Questi recettori appartengono alla famiglia del fattore di necrosi tumorale (TNF o Tumor Necrosis Factor) composta da diversi membri. Il TNF è una proteina di 157 amminoacidi con funzione di segnale intercellulare, appartenente alla classe delle citochine, è prodotto principalmente dai macrofagi ed è il principale mediatore estrinseco dell'apoptosi. I recettori del TNF possiedono un sottodominio extracellulare ricco di cisteine che gli permette di riconoscere specificatamente il loro ligando e un dominio intracellulare di circa 80 amminoacidi, chiamato dominio di morte

(DD o death domain), che svolge un ruolo critico nella trasmissione del segnale di morte cellulare dalla superficie ai pathway intracitoplasmatici. Al momento sei sono i recettori conosciuti: TNF-R1 o DR1, Fas o DR2 o CD95, DR3, TRAIL-R1 o DR4, TRAIL-R2 o DR5 e DR6 (36). Il pathway estrinseco è attivato dal legame di ogni singolo recettore al suo specifico ligando (TNF-R1/TNF α , FasR/FasL, DR4/TRAIL, DR5/TRAIL). Una volta attivato, il dominio DD si lega alla proteina adattatrice FADD (Fas associated death domain) o alla proteina TRADD (TNF-R1 associated death domain protein) per formare il complesso di induzione di morte o DISC. Questo complesso permette di reclutare la pro-caspasi 8 che viene attivata proteoliticamente e agisce da caspasi iniziatrice reclutando e attivando a sua volta le proteine effettrici, come la caspasi 3 e la caspasi 7, che provvederanno all'inizio della degradazione cellulare e al compimento del processo apoptotico (31, 37).

Il ligando TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) è in grado di iniziare la cascata apoptotica direttamente attivando le caspasi oppure in modo indiretto stimolando il rilascio di apoptogeni dai mitocondri (38).

La via apoptotica estrinseca è regolata a diversi livelli. Per prima cosa, l'espressione dei recettori di morte varia tra differenti tipi cellulari in diversi stadi dello sviluppo. Secondo, alcune cellule esprimono i recettori decoy che sono proteine di superficie o secrete capaci di interagire con i ligandi dei recettori di morte con alta affinità ma non in grado di trasdurre il segnale alle molecole adattatrici intracitoplasmatiche. Infine, la regolazione di questa via può dipendere dalla degradazione della pro-caspasi 8 (31).

- [VIA INTRINSECA O MITOCONDRIALE](#)

La via apoptotica intrinseca coinvolge i mitocondri ed è normalmente attivata in risposta alla perdita di fattori di crescita o a stimoli letali provenienti dall'interno della cellula come il danno al DNA, lo stress ossidativo, l'ipossia o agenti chemioterapici. I mitocondri, hanno una membrana esterna separata da quella interna dallo spazio intermembrana (IMS). Nell'IMS sono contenute molte delle proteine coinvolte nell'induzione di morte cellulare come il citocromo C (cyt C), i fattori inducenti l'apoptosi (AIF), Omi/HtrA2, EndoG e Smac/DIABLO. Tutti gli stimoli che provocano un cambiamento della membrana mitocondriale interna causano l'apertura del poro mitocondriale di transizione della permeabilità (MPT), perdita del potenziale mitocondriale transmembrana e rilascio delle proteine pro-apoptotiche dall'IMS al citosol. Dopo il rilascio nel citoplasma, il citocromo C stimola la formazione dell'apoptosoma, complesso composto dal fattore apoptotico attivatorio delle proteasi (Apaf-1), da dATP, dallo stesso citocromo C e dalla caspasi 9, con conseguente attivazione della pro-caspasi 9. Questa caspasi iniziatrice provoca l'attivazione delle caspasi effettrici 3, 6 e 7 che clivano substrati vitali causando la morte cellulare. L'attività catalitica del citocromo C è modulata dai membri della famiglia degli inibitori dell'apoptosi (IAP) che sono controllati a loro volta da altre due proteine mitocondriali, Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 (31).

Il pathway intrinseco è controllato dalle interazioni tra i membri pro-apoptotici o anti-apoptotici della famiglia delle proteine Bcl-2. Esistono almeno 20 proteine in questa famiglia divise in tre gruppi. I membri del gruppo 1 sono anti-apoptotici mentre quelli del gruppo 2 e del gruppo 3 sono pro-apoptotici. I membri della famiglia Bcl-2 possono essere definiti in base alla presenza di motivi conservati chiamati domini omologhi Bcl-2 (BH1, BH2, BH3, BH4).

Il pathway apoptotico può anche essere attivato da p53. Questa proteina infatti, è in grado di transattivare una serie di proteine pro-apoptotiche tra cui Bax, Puma, Noxa, oppure di traslocare direttamente nel mitocondrio dove lega membri anti-apoptotici come Bcl-2 e Bcl-xL. Infine, p53 induce anche la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di Fas/CD95 e di ridistribuirlo sulla membrana plasmatica cellulare (31).

1.3.2 L'AUTOFAGIA

L'autofagia, dal greco "auto" "phagein" cioè auto-digestione e chiamata anche morte cellulare di tipo II per distinguerla dall'apoptosi che è denominata morte cellulare di tipo I, è il processo tramite il quale gli organelli cellulari vengono indirizzati ai lisosomi per la loro massiva degradazione. Questo meccanismo ubiquitario rappresenta il principale responsabile del turnover per l'eliminazione degli organelli danneggiati, dei patogeni intracellulari, delle porzioni superflue di citoplasma così come delle proteine aggregate o aberranti (35) Inoltre, gioca un ruolo di primaria importanza nel rimodellamento cellulare dovuto al differenziamento, durante l'invecchiamento o come risposta allo stress cellulare. Sono stati identificati tre differenti tipi di autofagia con diverse caratteristiche. Il tipo maggiormente conosciuto e descritto è la macroautofagia, nella quale porzioni del citosol e interi organelli vengono racchiusi da strutture a doppia membrana chiamate autofagosomi o vacuoli autofagici precoci (AV-1). In seguito alla fusione con i lisosomi, gli autofagosomi formano strutture a singola membrana denominate auto lisosomi o vacuoli autofagici tardivi (AV-2) in cui il materiale luminale viene degradato ad opera delle proteasi acide lisosomiali. I prodotti di degradazione, tra cui aminoacidi e lipidi, sono poi rilasciati nel citoplasma tramite l'azione delle permeasi e dei trasportatori lisosomiali. L'autofagia può così essere considerata una centrale cellulare di riciclo che promuove produzione di energia tramite

la formazione di ATP e media il controllo dei danni cellulari rimuovendo organelli e proteine non funzionali (38). La regolazione della formazione dell'autofagosoma è complessa. Il principale regolatore negativo di questo processo è la chinasi target della rapamicina (mTOR) che, normalmente, mantiene a un livello basale l'autofagia ma che, una volta inibita, stimola l'induzione di macroautofagia. Anche l'ipossia è in grado di attivare l'autofagia tramite effetti che dipendono da geni target indotti dal fattore inducibile dell'ipossia (HIF) o da meccanismi HIF indipendenti che probabilmente sono riconducibili all'inibizione di mTOR (35, 38). Un altro tipo di autofagia è la microautofagia nel quale i target della degradazione vengono racchiusi direttamente dalla membrana dei lisosomi tramite le sue invaginazioni. Questo meccanismo è responsabile della degradazione di organelli e proteine danneggiate ma non è coinvolto nella risposta adattativa alle condizioni di mancanza di nutrienti cellulari. Il terzo tipo di autofagia è quello mediato dalle proteine chaperone (CMA). Durante la CMA, le proteine citosoliche che contengono una particolare sequenza target per i lisosomi, vengono riconosciute da un complesso di proteine chaperone, tra cui Hsp70 e Hsp73, che a sua volta è indirizzato al lisosoma dove si lega alla proteina LAMP2a (proteina di membrana associata ai lisosomi). Le proteine substrato vengono così denaturate e trasportate all'interno del lume lisosomiale per la degradazione (35, 38). L'autofagia può essere un meccanismo in grado di prevenire ma anche favorire lo sviluppo e la crescita delle cellule tumorali (33).

1.3.3 LA NECROSI

La necrosi, conosciuta anche come morte cellulare di tipo III, è spesso definita in maniera negativa come morte in assenza delle caratteristiche morfologiche dell'apoptosi e dell'autofagia ed è tipicamente considerata un meccanismo non regolato (39).

La necrosi è morfologicamente caratterizzata da aumento del volume cellulare (oncosi), dal rigonfiamento degli organelli citoplasmatici, dalla perdita dell'integrità della membrana plasmatica con conseguente perdita del materiale citosolico, dalla rottura casuale del DNA e dall'attivazione di una risposta infiammatoria tissutale (32,39). Recentemente, numerose evidenze dimostrano che la morte cellulare necrotica non sia un processo completamente accidentale ma che sia finemente regolato da un set di pathways di trasduzione del segnale e da meccanismi catabolici. Infatti, è stata riscontrata l'esistenza di una cascata di eventi successivi che caratterizzano la cellula che subisce il processo necrotico. Questa sequenza include segni precoci di disfunzione mitocondriale tra cui la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e rigonfiamento dei mitocondri, riduzione del contenuto di ATP, alterazione del metabolismo del calcio, addensamento perinucleare degli organelli, attivazione di alcune proteasi come catepsine e calpaine, rottura lisosomiale e della membrana plasmatica (39). Inoltre, l'inibizione di specifiche proteine coinvolte nell'apoptosi o nell'autofagia può indirizzare il processo di morte cellulare programmata in favore della necrosi. La necrosi può anche essere indotta dall'interazione di ligandi fisiologici con recettori presenti sulla superficie della membrana plasmatica. I recettori di morte TNFR1 e TRAIL-R e i recettori Toll-like TLR3 e TLR4, per esempio, sono in grado di attivare il processo necrotico soprattutto in presenza di inibitori delle caspasi. La morte cellulare mediata da questi recettori sembra dipendere dalla chinasi RIP1, il cui ruolo cruciale durante la necrosi è stato sperimentalmente dimostrato (32). Inoltre è noto che la necrosi cellulare è associata allo sviluppo di diverse malattie degenerative (39).

1.3.4 LA SENESCENZA CELLULARE

Il concetto di senescenza cellulare è stato introdotto per la prima volta circa 50 anni fa da Hayflick e Moorehead che proposero il dogma dell'immortalità delle cellule umane dimostrando che fibroblasti normali espianati in coltura, dopo un numero definito di divisioni cellulari, andavano incontro ad un permanente blocco della crescita (40). È ormai noto che questo meccanismo è mediato dai telomeri la cui lunghezza influenza la capacità proliferativa delle cellule. Infatti, le cellule tumorali sono in grado di riattivare la telomerasi, l'enzima responsabile della regolazione della lunghezza dei telomeri, apportandogli un vantaggio proliferativo e di sopravvivenza (41-42). Questo tipo di senescenza cellulare è definita "senescenza replicativa" (SR) ed è strettamente collegata all'invecchiamento cellulare. Recentemente, è stata descritta una seconda categoria di senescenza cellulare chiamata "senescenza indotta da stress" (SIS). Diversi sono gli stimoli che possono causare l'attivazione di questo meccanismo tra cui l'eccessivo danno al DNA, lo stress ossidativo, l'espressione inappropriata di oncogeni o geni onco-soppressori. La SIS non prevede il coinvolgimento dell'orologio biologico cellulare e l'accorciamento dei telomeri (41). Le caratteristiche fenotipiche di entrambi i meccanismi di senescenza cellulare sono condivise e includono la formazione di cellule allargate e appiattite, l'aumento della granulosità citoplasmatica e l'espressione di marker specifici di questo processo come la senescence-associated- β -galattosidasi (SA- β -gal). Sia la SR che la SIS condividono anche la via di segnale convergendo entrambe nel pathway di p53 e nel pathway di pRb. Tra questi due pathway esiste un ampio crosstalk per cui la regolazione della senescenza cellulare si sovrappone, in parte, a quello dell'induzione di morte cellulare.

Anche se la senescenza è considerata una risposta adattativa allo stress che permette di estendere la vita di un organismo, questo fenomeno può avere un impatto

negativo sulla sopravvivenza dello stesso organismo. Durante l'invecchiamento, il massivo accumulo di cellule senescenti riduce la capacità proliferativa del tessuto a causa di una diminuzione delle cellule staminali progenitrici. Questi effetti possono creare un ambiente permissivo che permette lo sviluppo di cellule pre-neoplastiche controbilanciando l'effetto sulla longevità con l'aumento del rischio di trasformazione tumorale (35). Per questa sua duplice funzione la senescenza cellulare sta diventando un interessante bersaglio per la terapia antitumorale. Diverse sono le molecole e i farmaci già testati che hanno come bersagli le proteine coinvolte nell'attivazione di questo processo.

1.3.5 LA CATASTROFE MITOTICA

In letteratura non è ancora presente una definizione chiara e concorde del processo di catastrofe mitotica. Questo termine viene ora utilizzato per indicare un meccanismo di morte cellulare ritardata legato alla mitosi e una sequenza di eventi che derivano da un prematuro ed inappropriato ingresso in mitosi delle cellule che può essere causato da stress chimici o fisici. La catastrofe mitotica può essere attivata da agenti in grado di influenzare la stabilità dei microtubuli, da farmaci anti-tumorali e dal fallimento della mitosi causato da difetti nei checkpoint del ciclo cellulare (43). Alcuni autori considerano la catastrofe mitotica in cellule di mammifero come l'incapacità di completare correttamente la mitosi in seguito a danno al DNA e in presenza di checkpoint inefficienti, una condizione che può determinare tetraploidia nel caso di un singolo ciclo cellulare oppure endopoliploidia dopo diversi cicli cellulari caratterizzati da esteso danno al DNA e riparazione, con la finale selezione di cellule apoptosi-resistenti, in grado di sopravvivere a diversi cicli di endoreplicazione (44). Un'altra definizione proposta per la catastrofe mitotica è quella di Castedo et al. in cui questo

meccanismo potrebbe risultare dalla combinazione di una deficienza dei checkpoint del ciclo cellulare e, in particolare, dei checkpoint che controllano l'integrità del DNA e il corretto assemblaggio del fuso mitotico, e di un danno cellulare. La cellula, incapace di bloccare il ciclo prima della mitosi, va incontro a un'aberrante segregazione cromosomica, che culmina nell'attivazione dei pathway apoptotici. La morte cellulare, che si verifica nella transizione tra metafase-anafase, è caratterizzata dall'attivazione della caspasi 2 e/o dalla permeabilizzazione della membrana mitocondriale con il conseguente rilascio degli effettori della morte cellulare come il fattore induttore dell'apoptosi o il citocromo c, attivatore della caspasi 9 e della caspasi 3. Si ritiene che la catastrofe mitotica sia profondamente diversa dall'apoptosi, in quanto, in alcuni modelli sperimentali, manipolazioni genetiche che prevengono l'apoptosi, come l'overespressione di Bcl-2 in cellule HeLa trattate con etoposide e l'overespressione di Mdr1 in cellule tumorali irradiate, possono aumentare il numero delle cellule che va incontro a catastrofe mitotica (42). Dal punto di vista morfologico, la catastrofe mitotica è un tipo di morte cellulare risultante da una mitosi aberrante che generalmente culmina nella formazione di cellule allargate non vitali con multipli micronuclei. Le cellule micronucleate, derivanti da questo processo, sono facilmente distinguibili da quelle apoptotiche grazie alla loro morfologia, infatti, sebbene anche le cellule apoptotiche possano presentare nuclei frammentati, queste ultime mostrano anche raggrinzimento del citoplasma e condensazione della cromatina, al contrario delle prime che sono larghe e contengono cromosomi non condensati. Inoltre, le cellule morte per catastrofe mitotica non presentano la tipica frammentazione del DNA e il DNA ladder tipico delle cellule apoptotiche (32, 42, 45). Nonostante ci sia consenso sulle caratteristiche morfologiche della catastrofe mitotica, una definizione univoca di questo processo non è stata ancora formulata. Principalmente sono quattro le descrizioni correnti (figura 1.4).

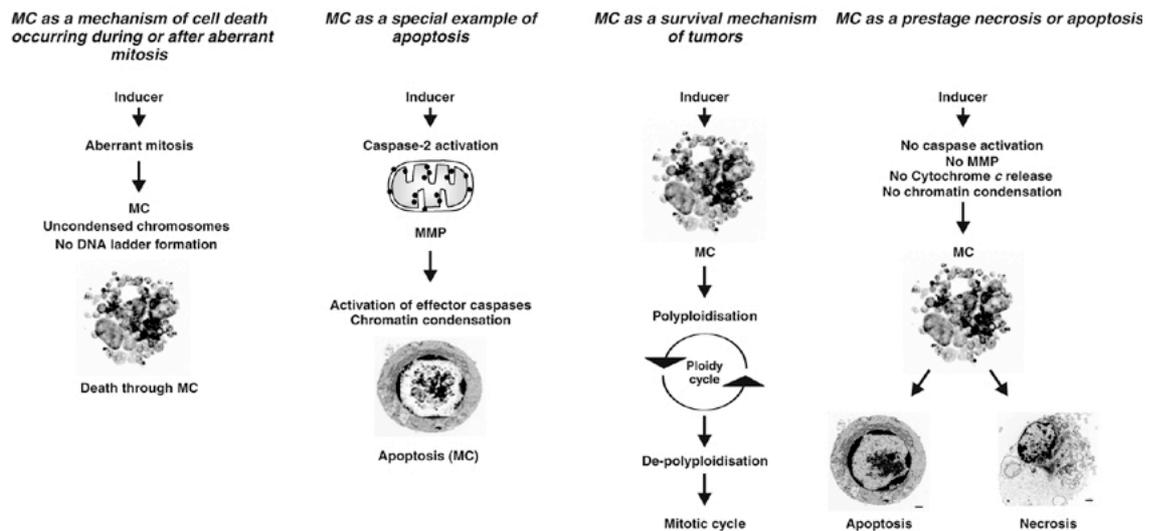


FIGURA 1.4: Riassunto dei concetti correnti di catastrofe mitotica (Vakifahmetoglu H et al, *Cell Death and Diff* 2008, 15, 1153-1162)

Il primo concetto considera la catastrofe mitotica un meccanismo di morte cellulare che avviene durante o successivamente una mitosi aberrante, il secondo ritiene non ci sia distinzione tra catastrofe mitotica e apoptosi per cui questo tipo di morte cellulare è soltanto una forma particolare di morte apoptotica, il terzo sostiene l'ipotesi che la catastrofe mitotica sia un meccanismo di sopravvivenza adottato in particolare dalle cellule tumorali e l'ultimo invece considera la catastrofe mitotica come uno stadio introduttivo per la morte cellulare apoptotica o necrotica (43).

Molti sono i fattori che sembrano essere coinvolti nella regolazione della catastrofe mitotica tra cui, in particolare, chinasi specifiche del ciclo cellulare (aurora chinasi, Cdk1, polo-like chinasi), proteine dei checkpoint del ciclo cellulare, survivina, p53, caspasi e i membri della famiglia di Bcl-2 (45). Cdk1 interagisce con la ciclina B1 per formare un eterodimero chiamato "fattore promuovente la mitosi". La progressione dalla fase G2 alla fase M richiede l'attivazione di questo complesso. Il successivo inizio dell'anafase e la conclusione della mitosi sono invece strettamente dipendenti dalla rapida degradazione di questo complesso da parte di APC. Il complesso Cdk1/ciclina

B1 induce la mitosi fosforilando e attivando gli enzimi che regolano la condensazione cromatinica, la rottura della membrana nucleare, la riorganizzazione dei microtubuli e dello scheletro di actina necessario per la corretta divisione cellulare. La perfetta regolazione spazio-temporale di questo complesso è quindi fondamentale per il corretto esito del ciclo cellulare. L'errata entrata in mitosi delle cellule può causare catastrofe mitotica e ovviamente questo meccanismo richiede l'attivazione di Cdk1. L'ingresso prematuro del complesso Cdk1/ciclina B1 nel nucleo può causare prematura condensazione cromatinica (PCC) e apoptosi. Infatti, alti livelli di ciclina B1 sono stati riscontrati in numerosi esempi di catastrofe mitotica indotta da manipolazioni farmacologiche o genetiche delle cellule. In maniera simile, la prolungata inibizione di APC, che provoca una persistente attivazione di Cdk1, può causare catastrofe mitotica associata alla overduplicazione dei centrosomi (45). L'attivazione di Cdk1 può anche indurre la permeabilizzazione della membrana mitocondriale (MMP) tramite la fosforilazione di Bad, un membro della famiglia dei fattori pro-apototici di Bcl-2. In seguito alla fosforilazione, Bad trasloca nel mitocondrio dove attiva Bax che induce la morte cellulare. In alternativa, la prolungata attivazione di Cdk1 può incrementare, in maniera indiretta, l'attività di p53 che a sua volta innesca la cascata apoptotica mitocondriale. Un secondo importante regolatore della catastrofe mitotica è la chinasi Chk2. Il checkpoint che controlla il corretto stato del DNA è fondamentale per evitare l'induzione di morte cellulare per catastrofe mitotica. Il danno al DNA è riconosciuto da alcuni sensori cellulari che inviano segnali ad altre chinasi, tra cui ATM e ATR che a loro volta attivano per fosforilazione Chk2 che blocca il ciclo cellulare. In risposta al danno al DNA, Chk2 colocalizza e interagisce con Plk1 sul centrosoma ed è in grado di attivare/disattivare tramite fosforilazione moltissimi bersagli, quali p53, MDM2, Bub1 ecc. Inoltre, Chk2 fosforila il fattore di trascrizione E2F1, attivando così la trascrizione

delle proteine pro-apoptotiche apaf1 e p73. L'effetto pleiotropico di Chk2 può quindi favorire l'apoptosi e bloccare il ciclo cellulare in diversi punti mentre mutazioni di questa chinasi sono responsabili di un incremento dell'instabilità genomica e sono correlate con lo sviluppo tumorale. In conclusione, sembra che l'integrità dei checkpoint mitotici e Chk2 regolino negativamente la catastrofe mitotica, suggerendo che l'inattivazione di Chk2 possa sensibilizzare la cellula verso questo tipo di morte cellulare (45). Un'altra proteina coinvolta nel controllo della catastrofe mitotica è la survivina. Questa proteina è interessante per almeno tre motivi: la survivina è spesso overespressa nei tumori dove correla con ridotta sopravvivenza, prognosi sfavorevole e chemioresistenza; la survivina è un membro delle proteine inibitorie dell'apoptosi e sembra sia in grado di sopprimere l'attivazione delle caspasi; la survivina mostra una particolare distribuzione subcellulare dipendente dal ciclo cellulare, è substrato di Cdk1 e contribuisce al checkpoint del fuso mitotico.

Centrale nella regolazione della catastrofe mitotica è la proteina p53. In seguito a danno del fuso mitotico, le cellule si arrestano in maniera transiente tra metafase e anafase. Se il blocco viene superato, le cellule escono dalla mitosi senza che sia avvenuta una normale segregazione dei cromosomi. Queste cellule si arrestano definitivamente in G1 grazie all'azione di p53. In cellule in cui p53 è assente o non funzionale, non esiste nessun impedimento per il rientro nel ciclo cellulare e per la replicazione del DNA portando alla formazione di cellule poliploidi caratterizzate da forte instabilità cromosomica. Questa endoreplicazione del contenuto genetico conduce all'attivazione dell'apoptosi principalmente durante la fase S. Uno dei geni indotti da p53 è quello della chinasi Plk2. Il knock down di questa proteina aumenta la sensibilità delle cellule all'apoptosi e questa morte avviene durante la mitosi in cellule con un contenuto di DNA pari a 4N e alti livelli di ciclina B1 e prevede l'attivazione della

caspasi 3. Per questo motivo Plk2 potrebbe essere considerata un inibitore endogeno della catastrofe mitotica la cui espressione è sotto il controllo di p53 (45).

La catastrofe mitotica è quindi un meccanismo complesso e la sua considerazione come meccanismo di morte cellulare indipendente è ancora dibattuta.

1.3.5.1 CATASTROFE MITOTICA E FARMACI ANTITUMORALI

La catastrofe mitotica è la forma di morte cellulare indotta più spesso dalle radiazioni ionizzanti ed è stata identificata come predominante risposta in seguito a trattamenti con agenti antitumorali quali etoposide, taxolo, cisplatino e bleomicina (42). Il trattamento di cellule tumorali HT1080, derivate da fibrosarcoma, con uguali dosi di chemioterapici ha indotto catastrofe mitotica in un'alta frazione cellulare (45-66%). L'apoptosi e la senescenza non sono risposte cellulari specifiche per le cellule tumorali ma agiscono come meccanismi di controllo dei danni cellulari nelle cellule normali. Al contrario, la catastrofe mitotica è associata ai più comuni cambiamenti cellulari riscontrati durante il processo della carcinogenesi. Circa tutti i tumori sono deficitari di alcuni checkpoint cellulari e in particolare il checkpoint di fase G2 è importante per impedire la catastrofe mitotica in cellule trattate con agenti anti-tumorali. Questo checkpoint comprende meccanismi che sono p53 dipendenti o p53 indipendenti. Molti dei tumori umani sono caratterizzati dall'assenza o dalla mutazione di questa proteina e questo potrebbe rappresentare uno dei motivi per cui le cellule tumorali muoiono preferenzialmente per catastrofe mitotica (42). Uno dei meccanismi più studiati e meglio compresi di catastrofe mitotica è quello indotto dagli agenti in grado di depolimerizzare (alcaloidi della Vinca) o iperpolimerizzare (taxani) i microtubuli. Questi agenti interferiscono direttamente con la mitosi poichè il loro bersaglio è rappresentato dal fuso mitotico. Infatti, in presenza di paclitaxel (Taxolo), i cromosomi

si accumulano in metafasi anomale, formano dei cluster casuali e si decondensano. Questi gruppi di cromatina vengono separati da una lamina membranosa, con la conseguente formazione di una membrana nucleare multipla. La decondensazione dei cromosomi sembra essere sufficiente a causare la riformazione della membrana nucleare con induzione del fenomeno della micronucleazione, conseguenza diretta della mancata o anormale segregazione dei cromosomi. Gli agenti depolimerizzanti invece provocano anomalie mitotiche differenti rispetto ai taxani, ma la loro azione culmina ugualmente con l'attivazione della morte cellulare per catastrofe mitotica. Indipendentemente dal farmaco somministrato, la differente sensibilità dei diversi tipi tumorali nei confronti di questi agenti dipende probabilmente dalla variabilità delle mutazioni presenti nei checkpoint in profase e nel checkpoint a livello della formazione del fuso (42). Un altro meccanismo che coinvolge l'attivazione della catastrofe mitotica è il trattamento dei tumori solidi con agenti in grado di provocare danno al DNA. La catastrofe mitotica può essere osservata in cellule bloccate in precedenza in pro-metafase dal trattamento con agenti depolimerizzanti i microtubuli come il nocodazolo e in seguito esposte ad agenti danneggianti il DNA. Questo tipo d'induzione di catastrofe mitotica sembra dipendere principalmente da tre parametri. Il primo è che questi agenti, anche senza il trattamento con gli agenti in grado di interferire con i microtubuli, sono in grado di causare catastrofe mitotica in alcune circostanze. Il secondo parametro è la dose utilizzata di questi farmaci e il terzo è conseguenza della mancanza della proteina p53 normale o della sua inibizione tramite il trattamento con alcune sostanze (47). Nonostante l'induzione prematura della mitosi sia la principale causa di catastrofe mitotica, non è l'unico meccanismo coinvolto. Diversi gruppi hanno dimostrato che mitosi anomale sono associate con l'anomala duplicazione dei centrosomi e dato che, questo processo avviene a cavallo della fase G1 e S, è improbabile che il prematuro

ingresso in mitosi possa influenzare questo meccanismo. Sia l'overduplicazione dei centrosomi con mitosi multipolari o la mancata duplicazione dei centrosomi con mitosi unipolari portano al fallimento della segregazione cromosomica e alla morte cellulare per catastrofe mitotica (42).

Ad esempio, è stato dimostrato che il trattamento con dosi moderate di doxorubicina di cellule HT1080 causava figure mitotiche aberranti, alcune delle quali indicative di centrosomi anormali e altre di allineamento e segregazione cromosomica impropri. Tra le figure mitotiche anormali presenti, sono state riscontrate anafasi e telofasi ritardate, che indicano la mancata segregazione dei cromosomi, oppure mitosi multipolari, che derivano dalla overduplicazione dei centrosomi, e la C-mitosi, un termine coniato per indicare la distribuzione casuale di cromosomi condensati nella cellula. La C-mitosi è stata osservata anche in cellule che non hanno duplicato il loro centrosoma e sembra essere seguita dalla frammentazione nucleare, causando la formazione di un alto numero di micronuclei per cellula.

Diverse evidenze sperimentali hanno suggerito l'esistenza di due forme di catastrofe mitotica apparentemente dovute a meccanismi differenti: la catastrofe mitotica precoce e la catastrofe mitotica tardiva. La prima avviene in cellule che entrano in mitosi prematuramente dopo danno al DNA ed è potenziata da mutazioni tumore-specifiche o da agenti, come la caffeina, in grado di annullare il checkpoint in fase G2. La seconda, ovvero la catastrofe mitotica ritardata, si sviluppa in cellule tumorali che rientrano nel ciclo cellulare dopo trattamenti che inducono il blocco della crescita; questa forma sembra potenziata, più che prevenuta, dai mediatori dei checkpoint in fase G1 e fase G2 come la proteina p21. Rimane da chiarire se le mutazioni tumore-specifiche nei checkpoint mitotici giocano un ruolo fondamentale nell'induzione della suscettibilità alla catastrofe mitotica tardiva (42).

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di comprendere il meccanismo con cui la purina sintetica reversina agisca in modo diverso quando utilizzata su cellule “normali”, come fibroblasti o cellule staminali adulte, o su cellule tumorali. Infatti, mentre sulle prime l’azione della molecola è quella di bloccarne la proliferazione e di indurne il de-differenziamento, sulle cellule tumorali, nelle stesse condizioni sperimentali, risulta essere letale.

Al fine di comprendere questo differente comportamento, si è pensato di valutare gli effetti della reversina su tre linee cellulari tumorali: le cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE, le cellule di fibrosarcoma umano HT1080 e le cellule di carcinoma della cervice uterina HeLa. In particolare, sulla base di precedenti studi su cellule “normali”, si è pensato di valutare gli effetti della molecola sulla proliferazione e sul ciclo cellulare delle cellule tumorali studiate, e di confrontarli con quanto osservato in precedenza su cellule normali.

In fine, sulla base dei risultati ottenuti, è stata formulata e successivamente dimostrata sperimentalmente un’ipotesi sul meccanismo d’azione della molecola, che mostra come i differenti effetti della molecola siano strettamente legati allo stato di funzionamento dei check point del ciclo cellulare delle cellule trattate.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

Le linee cellulari utilizzate in questa tesi sono: fibroblasti umani di derma da donatore sano (gentilmente fornite dal Prof. Giulio Cossu dell'Università degli Studi di Milano e dell'ospedale San Raffaele di Milano), cellule delle linee tumorali SK-N-BE, HeLa HT1080 e colture primarie di cellule staminali tumorali (gentilmente fornite dalla Prof.ssa Petroni, dal Prof. Eugenio Monti e dalla Prof.ssa Rossella Galli rispettivamente dell'Università degli Studi di Milano, dell'Università degli Studi di Brescia e dell'ospedale San Raffaele di Milano). Le cellule SK-N-BE sono una linea di neuroblastoma umano, ottenuta per la prima volta presso il Memorial Sloane-Kettering Hospital di New York, N.Y. U.S.A (48). Queste cellule presentano alcune proprietà biochimiche tipiche delle cellule neuronali e caratteristiche multipotenziali per quanto riguarda l'espressione di enzimi neuronali. Trattate con acido retinoico sono in grado di differenziare e acquisire un fenotipo neuronale colinergico maturo. Le cellule HT1080 sono state isolate presso la School of Medicine della University of Southern California nel 1972 dalla biopsia di fibrosarcoma di un paziente di 35 anni che morì senza essere stato sottoposto a chemioterapia o radioterapia (49). Queste cellule di fibrosarcoma umano sono indifferenziate e possiedono un alto potenziale proliferativo, presentano un cariotipo aberrante pseudodiploide ($2n = 46$ cromosomi) ed esprimono l'oncogene Ras. Le colture primarie di fibroblasti di derma umano sono state utilizzate come cellule di controllo in tutti gli esperimenti effettuati. Le cellule umane HeLa sono una linea di cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate, il cui utilizzo è largamente diffuso in molti laboratori di ricerca (50). Questa linea cellulare è stata isolata da un cancro della cervice uterina di Henrietta Lacks, da cui il nome HeLa, che morì di questo cancro nel 1951. Queste cellule sono caratterizzate da un'altissima resistenza in

condizioni di stress elevato, paragonate anche con altre cellule tumorali, e sono addirittura in grado di vivere per un periodo relativamente lungo di tempo in assenza di terreno di coltura. Le cellule HeLa possono dividersi un maggior numero di volte rispetto ad altre cellule e, probabilmente, questa caratteristica dipende dalla presenza di una mutazione dell'enzima telomerasi che previene l'accorciamento dei telomeri durante la replicazione del DNA. Infine, le cellule HeLa possiedono 82 cromosomi, quattro copie del cromosoma 12 e tre copie dei cromosomi 6, 8, e 17. Tali modificazioni del corredo cromosomico sono dovute a una mutazione orizzontale indotta dal Papilloma virus, responsabile di quasi la totalità dei carcinomi cervicali, che tende a integrarsi nelle cellule della cervice uterina generando dispersione e amplificazione del gene c-myc, e causando di conseguenza la trasformazione neoplastica.

3.1.1 CONDIZIONI DI COLTURA E MANTENIMENTO DELLE LINEE CELLULARI

Le cellule sono state mantenute in coltura in incubatore termostato a 37° C, 80% di umidità, e una concentrazione di CO₂ pari al 5%. Per tutte le linee cellulari impiegate è stato usato terreno DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) ad alta concentrazione di glucosio (4.5 g/L), contenente: sodio piruvato 1 mM, penicillina 100 U/mL, streptomina 100 µg/mL, glutamina 4 mM e 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS). Le cellule staminali tumorali sono state invece mantenute in terreno DMEM/F12 contenente 20 ng/ml di epidermal growth factor (EGF) e 20 ng/ml di fibroblast growth factor-2 (FGF). Le cellule sono state divise ogni 3-4 giorni circa utilizzando il metodo classico del distacco enzimatico tramite tripsina. Dopo l'aspirazione del terreno di coltura, sono stati effettuati due lavaggi con PBS, è stata utilizzata una soluzione di tripsina (0.05%) ed EDTA (0.02%) in PBS e, dopo aver controllato il distacco delle

cellule al microscopio ottico, l'azione enzimatica della tripsina è stata bloccata mediante l'aggiunta il terreno di crescita completo, contenente FBS. Le cellule distaccate sono state centrifugate a 145 rcf per 10 minuti. Infine, le cellule sono state risospese in un opportuno volume di terreno di coltura e sono state contate utilizzando la camera di Burker.

Le cellule sono state controllate ogni giorno al microscopio ottico per valutarne la morfologia e il grado di confluenza in modo da garantire l'utilizzo di cellule uniformi e in buone condizioni di salute.

3.1.2 CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DELLE CELLULE

Il congelamento in azoto liquido (-196°C) consente di conservare le cellule inalterate per lunghi periodi di tempo. Tutte le cellule impiegate sono state congelate utilizzando un medium di congelamento costituito da FBS 90% (v/v) e DMSO 10% (v/v). Lo scongelamento è stato eseguito in maniera rapida in bagnetto termostato a 37°C e la sospensione cellulare è stata diluita con terreno completo per poi essere piastrata nelle adeguate condizioni. Il giorno seguente lo scongelamento è sempre stato cambiato il mezzo di coltura.

3.1.3 TRATTAMENTO CON REVERSINA

La reversina è stata sintetizzata nel nostro laboratorio secondo la procedura pubblicata in letteratura (10) e la sua purezza ($\geq 98\%$) è stata controllata tramite HPLC e LS-MS. Il solvente in cui è stata disciolta la reversina è il DMSO. Le cellule sono state trattate 24 ore dopo il piastramento per tempi diversi, e con diverse concentrazioni di reversina, in terreno di coltura completo. Parallelamente, le cellule di controllo sono state trattate con

le stesse quantità di DMSO utilizzate per dissolvere la reversina, che in tutti gli esperimenti è stata inferiore allo 0.05%.

3.1.5 TRATTAMENTO CON PIFITRINA- α

La pifitrina- α (2-2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyethanone hydrobromide) è un inibitore reversibile dell'apoptosi mediata da p53 e della trascrizione genica p53 dipendente. Questa molecola inibisce quindi anche la via di segnale di p21^{Waf1/Cip1} e l'espressione di MDM2. Solitamente, le cellule dopo trattamento con pifitrina- α mostrano un'aumentata sopravvivenza allo stress genotossico (radiazioni UV, taxolo ecc). La pifitrina- α è solubile in DMSO alla concentrazione di 20 mg/ml.

Le cellule sono state pretrattate con pifitrina- α 10 μ M per due ore al termine delle quali il terreno di coltura è stato sostituito con un mezzo completo contenente sia la pifitrina- α 10 μ M sia la reversina 5 μ M. Ogni 48 ore è stata aggiunta direttamente al terreno di coltura la pifitrina- α 10 μ M. Come controllo sono state utilizzate cellule trattate solo con DMSO e cellule trattate solo con pifitrina- α . Ogni giorno è stata valutata la crescita e la vitalità cellulare tramite conta cellulare con il colorante vitale trypan blue.

3.2 CURVE DI CRESCITA

Le cellule sono state piastrate in piastre di diametro pari a 100 mm alla densità cellulare di 2000 cellule per cm². Il giorno successivo al piastramento, considerato il giorno 0, le cellule sono state trattate con reversina o con le corrispondenti concentrazioni di DMSO. La morfologia cellulare è stata controllata ogni giorno con un microscopio a contrasto di fase collegato a un analizzatore d'immagini. Le cellule sono state contate con la camera di Burker utilizzando la colorazione vitale con Trypan blue.

3.2.1 CONTEGGIO CELLULARE CON COLORANTE VITALE TRYPAN BLUE

Le cellule sono state contate dopo essere state staccate dalle piastre mediante l'utilizzo di tripsina. Il terreno di coltura è stato rimosso e sono stati effettuati due lavaggi con PBS per rimuovere ogni traccia di FBS, in grado di inibire l'azione enzimatica della tripsina. In seguito, è stata impiegata una soluzione di tripsina (0,05%) ed EDTA (0,02%) per il distacco delle cellule. L'azione dell'enzima è stata bloccata aggiungendo il terreno di crescita completo. Le cellule sono state centrifugate alla velocità di 145 rcf per 10 minuti ed è stato scartato il surnatante. Successivamente, le cellule sono state risospese con un opportuno volume di PBS. L'utilizzo del PBS al posto del normale mezzo di coltura è dovuto al fatto che il trypan blue è in grado di legarsi alle proteine del siero presenti nell'FBS del terreno di crescita generando una marcata colorazione di fondo blu rendendo così più difficile il corretto conteggio delle cellule. Il trypan blue è un colorante tossico e potenzialmente cancerogeno. Per la colorazione si utilizza una soluzione alla concentrazione di 0,4% (w/v). La definizione di colorante vitale deriva dal fatto che il trypan blue non viene assunto dalle cellule vive, mentre penetra per diffusione attraverso la membrana cellulare danneggiata delle cellule morte, che così assumono una chiara colorazione blu. Le cellule sono state diluite secondo un rapporto pari a 1:1 tra volume cellulare e volume di trypan blue e sono state contate con la camera di Burker al microscopio ottico utilizzando un obiettivo 10x. Le cellule vive hanno una morfologia tondeggianti e sono traslucide, quelle morte, avendo incorporato il colorante, assumono una colorazione blu/viola diffusa all'interno del citoplasma cellulare. E' stata quindi calcolata la vitalità cellulare considerando il numero totale di cellule vive in rapporto al numero totale di cellule presenti in ogni singola piastra.

3.3 ANALISI DELL'ATTIVAZIONE DI PATHWAY APOPTOTICI

L'attivazione di pathway apoptotici in cellule SK-N-BE, HT1080, HeLa e fibroblasti umani di derma è stata determinata con diversi approcci sperimentali tra l'identificazione del frammento attivo della caspasi 3 (17 kDa) e la rilevazione della condensazione cromatinica tipica delle cellule in apoptosi. Le cellule sono state trattate con reversina o con le corrispondenti quantità di DMSO un giorno dopo il piastramento. Le analisi sono state condotte a differenti tempi di trattamento.

3.3.1 ANALISI DELLA CONDENSAZIONE CROMATINICA

Le cellule sono state piastrate alla densità di 2000 cellule per cm² in piastre dal diametro di 35 mm e sono state trattate per diversi tempi con reversina o DMSO. Successivamente, sono stati effettuati due lavaggi in PBS e le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% (w/v) per 10 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate ulteriormente tre volte con PBS e incubate per 15 minuti con 10 µg/ml di DAPI, al buio e a temperatura ambiente. Infine, le cellule, dopo essere state lavate con PBS per rimuovere l'eccesso di DAPI, sono state osservate al microscopio a fluorescenza (λ di eccitazione 345 nm, λ di emissione 478 nm) e sono state acquisite le immagini.

3.3.2 WESTERN BLOT

Il metodo convenzionale per analizzare l'espressione di specifiche proteine sintetizzate dalla cellula sfrutta la tecnica dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS polyacrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). In generale, se l'analisi viene effettuata solamente mediante colorazione del gel con un generico colorante per proteine, la specificità del segnale è molto bassa e non può fornire un

quadro chiaro e preciso del completo profilo proteico, sebbene una maggiore risoluzione possa essere ottenuta mediante elettroforesi bidimensionale. Le tecniche generalmente applicabili per l'identificazione di una specifica proteina, e quindi per l'analisi della sua espressione, si basano sull'uso di anticorpi specifici in combinazione con la tecnica dell'SDS-PAGE. Questa tecnica permette non solo di identificare la presenza o l'assenza di una specifica proteina in grado di reagire con l'anticorpo, ma fornisce anche una stima del suo peso molecolare e del suo livello relativo di espressione. Il Western Blot è adatto per l'analisi di una singola proteina o di poche proteine ma, se si desidera ottenere una visione più completa della composizione proteica totale di un determinato campione, è preferibile ricorrere ad altre tecniche, come, ad esempio, l'elettroforesi bidimensionale.

3.3.3 RACCOLTA DELLE CELLULE

Le cellule sono state raccolte staccandole meccanicamente con scraper in PBS freddo (pH 7.4) in ghiaccio e successivamente sono state centrifugate a 805 rcf per 10 minuti a 4°C. Dopo aver aspirato il sovrantante, il pellet è stato risospeso in PBS a pH 7,4 contenente una miscela di inibitori delle proteasi composta da Aprotinina (10 µg/ml), Leupeptina (10 µg/ml) e Pepstatina A (1 µg/ml). Le cellule sono state rotte sonicandole alla frequenza di 40 Hz per circa 8 secondi per 2 volte in ghiaccio mediante sonicatore a sonda e sull'omogenato è stato in seguito effettuato il dosaggio proteico secondo il metodo di Bradford.

3.3.4 DOSAGGIO DELLE PROTEINE SECONDO IL METODO DI BRADFORD

Il metodo di Bradford si basa sull'utilizzo del colorante Blu di Comassie che, in ambiente acido, si lega ai residui aminoacidici carichi delle proteine. In queste

condizioni, il picco di assorbanza del colorante passa da 465 nm a 595 nm. Per determinare la concentrazione proteica dei campioni è stata allestita una retta di taratura utilizzando come standard dell'albumina di siero bovino (BSA) a concentrazioni note pari a 1µg, 2µg e 3µg. A tutti i campioni è stato aggiunto 1 ml di colorante Blu di Comassie diluito 1:4 con acqua ed è stata effettuata un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente. I valori di assorbanza sono stati determinati mediante lettura con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Utilizzando la retta di taratura è stato poi possibile risalire alla concentrazione proteica dei campioni espressa µg/µl.

3.3.5 ELETTROFORESI SDS-PAGE

Le proteine estratte dalle cellule sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% (w/v), in condizioni denaturanti grazie alla presenza del detergente anionico Sodio Dodecil Solfato (SDS). E' stato preparato un gel discontinuo costituito dallo stacking gel al 4% e dal running gel. La composizione del running gel è la seguente: acqua deionizzata, Tris-HCl 1,5 M a pH 8.8, SDS 0,1% (w/v), acrilammide AA 33% (w/v), persolfato di ammonio (APS) 10% (w/v), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamine). La composizione dello stacking gel è invece la seguente: acqua deionizzata, Tris-HCl 0,5 M a pH 6.8, SDS 0,1% (w/v), acrilamide AA 33% (w/v), APS 10% (w/v) e TEMED.

I campioni sono stati diluiti con sample buffer 4X (Tris-HCL 62,5 mM pH 6.8, SDS 2% (w/v), glicerolo 10% (v/v), 2-mercaptoetanololo 5% (w/v), blu di bromofenolo 0,01% (w/v) e denaturati per 5 minuti a 100°C. Sono stati utilizzati 30 – 40 – 60 µg di proteine per ogni campione e la corsa elettroforetica è stata effettuata a temperatura ambiente, in tampone Tris HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0.1% (w/v), a un voltaggio costante di 100 Volt fino al termine della migrazione proteica. Le proteine sono state

poi trasferite su una membrana di PVDF Hybond-P dopo aver equilibrato il gel 30 minuti in transfer buffer (Tris/HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, metanolo 20% (v/v) e aver attivato la membrana in metanolo per 10 secondi ed equilibrata per 5 minuti in transfer buffer. Il trasferimento è stato condotto overnight a 30 Volt costanti a 4°C. Successivamente, al fine di saturare eventuali siti di binding aspecifico, la membrana di PVDF è stata incubata in agitazione per 1 ora con il blocking buffer costituito da PBS, Tween 20 0,1% (v/v) e latte in polvere alla concentrazione pari al 5% (w/v). La membrana è stata quindi lavata in un tampone di lavaggio costituito da PBS e Tween 20 0,1% (v/v) per 3 volte 5 minuti ciascuna in agitazione ed è stata poi effettuata l'incubazione di 1 ora con l'anticorpo primario anti-caspasi 3, in grado di riconoscere il frammento attivo di questa proteasi, diluito appropriatamente con blocking buffer (1:500). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, sono stati effettuati numerosi lavaggi in PBS-Tween 20 0,1%, (v/v) per rimuovere l'eccesso di anticorpo e la membrana è stata ibridata con l'anticorpo secondario, coniugato all'enzima perossidasi, in grado di legarsi al corrispettivo anticorpo primario, per 1 h a temperatura ambiente in agitazione. La diluizione dell'anticorpo secondario applicata (1:2000) è stata preparata in blocking buffer. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati 4 lavaggi in PBS-Tween 20 0,1%, (v/v) di 5 minuti ciascuno e la membrana è stata incubata con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, substrato della perossidasi, per 5 minuti al buio, per poter visualizzare le bande corrispondenti alle proteine di interesse.

3.3.6 ANALISI DELL'ATTIVAZIONE DELLA CASPASI-3 MEDIANTE TECNICHE DI CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

Le cellule SK-N-BE sono state piastrate in piastre dal diametro di 100 mm alla densità di 2000 cellule per cm². Sono stati effettuati trattamenti con reversina 5 µM, DMSO

0,05% (v/v) o Camptotecina 10 μ M per 24 ore. Le cellule sono state raccolte utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 163 rcf, 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state contate e per l'analisi sono state utilizzate 3×10^6 cellule SK-N-BE successivamente ricentrifugate e fissate in cytoperm(R) (1mL/ 10^6 cellule). Dopo la fissazione le cellule sono state conservate a 4°C fino al momento dell'analisi. I campioni sono stati analizzati presso il laboratorio del Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'Università di Milano-Bicocca utilizzando un citofluorimetro a flusso FACSCalibur (BD Biosciences). I risultati sono stati valutati con il software Summit 4.3 (Cytomation Coulter, Glostrup, Danimarca).

3.3.7 VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3/7 IN LUMINESCENZA

È stato utilizzato il kit caspase-Glo® 3/7 assay della ditta Promega per indagare l'attivazione delle caspasi effettrici 3 e 7. Questo kit fornisce un substrato luminescente della caspasi 3/7 che contiene un tetrapeptide DEVD in un reagente ottimizzato per l'attività delle caspasi, la luciferasi e un tampone di lisi cellulare. Le caspasi riconoscono e tagliano questa sequenza DEVD liberando amino-luciferina, un substrato della luciferasi. Successivamente, la reazione della luciferasi determina emissione di luce (Figura 3.1). Le cellule sono state piastrate in piastra multiple da 96 pozzetti alla densità cellulare di 2000 cellule per cm^2 . I trattamenti con reversina 5 μ M o DMSO 0,05% sono stati effettuati per 24-48-72 ore. L'incubazione delle cellule con il substrato è stata condotta a temperatura ambiente per 1 ora. La luminescenza emessa è proporzionale al livello di attività delle proteasi e può essere registrata utilizzando un luminometro.

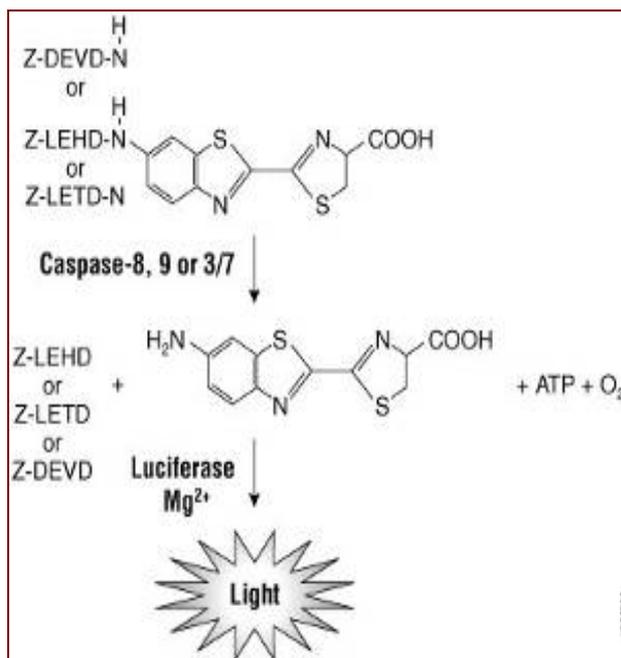


FIGURA 3.1: Schema di funzionamento del kit caspase-Glo® 3/7 assay

3.4 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante citofluorimetria a flusso, una tecnica che permette di determinare il contenuto nucleare di DNA. Le cellule vengono colorate con un colorante fluorescente (ioduro di propidio o PI) che si lega stechiometricamente al DNA. Eccitando il fluorocromo a una lunghezza d'onda appropriata (luce di eccitamento), questo emette una luce a lunghezza d'onda superiore (luce di emissione) d'intensità proporzionale alla quantità di fluorocromo legato. Essendo il legame fluorocromo - DNA stechiometrico, la luce di emissione ha intensità proporzionale al contenuto cellulare di DNA.

Le cellule sono state piastrate in fiasche da 75 cm² alla densità cellulare di 2000 cellule per cm² e sono state trattate per 3-6-24-48-72 ore con reversina 5 µM o DMSO 0,05%. Al termine del trattamento le cellule sono state raccolte utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA e centrifugate a 163 rcf, 10 minuti a temperatura ambiente. Il pellet cellulare è stato risospeso in 600 µl di PBS freddo al quale sono stati aggiunti 1,4 ml di

etanolo al 96% freddo, tenendo il campione in agitazione su vortex. Le cellule fissate in etanolo sono state conservate a 4°C fino al momento dell'analisi. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata su almeno 30000 eventi per ogni campione e le cellule sono state colorate con ioduro di propidio in un tampone RNasi DNasi-free (per evitare il legame del colorante all'RNA), alla concentrazione finale di 10 µg/ml per 30 minuti a 37°C. Questo fluorocromo (λ di eccitamento 488 nm, λ di emissione 585 nm) è un intercalante che si lega con buona specificità agli acidi nucleici. I campioni sono stati quindi analizzati mediante un citofluorimetro a flusso FACSCalibur della ditta BD Biosciences e i dati ottenuti sono stati analizzati con il software Summit 4.3 (Cytomation Coulter, Glostrup, Danimarca).

3.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

3.5.1 ESTRAZIONE DELL'mRNA

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato l'RNeasy Mini Kit QUIAGEN. Le cellule sono state raccolte utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA e centrifugate a 300 rcf per 5 minuti. Il pellet cellulare ottenuto è stato lisato aggiungendo 350 µl di tampone di lisi RLT+ β -mercaptoetanolo e agitandolo su vortex fino a completa omogenizzazione. È stato poi aggiunto un volume di etanolo al 70% che crea le condizioni favorevoli di legame a membrane di gel di silice. I campioni sono stati trasferiti nelle apposite colonnine contenenti il gel di silice che lega selettivamente gli acidi nucleici e permette di eliminare tutte le parti contaminanti mediante lavaggi con appositi tamponi. Per eliminare la contaminazione da DNA genomico, i campioni sono stati trattati con DNAsi (27 U) per 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente. L'RNA messaggero è stato infine eluito in un volume appropriato di acqua in base alla quantità del materiale di partenza. L'RNA estratto è stato conservato a -80°C

3.5.2 DOSAGGIO DELL'RNA

Il dosaggio dell'RNA è stato effettuato utilizzando il RiboGreen (Molecular Probes), un reagente fluorescente contenente cianina. Questo metodo di dosaggio sfrutta la capacità di questo reagente di aumentare la sua intensità di fluorescenza una volta legato agli acidi nucleici. Il RiboGreen ha un massimo di eccitazione alla lunghezza d'onda di 500 nm e un massimo di emissione a circa 525 nm. Questo dosaggio è più sensibile rispetto alla misurazione effettuata mediante spettrofotometro e possiede il vantaggio di non risentire dell'interferenza di componenti che contaminano la soluzione di RNA, quali nucleotidi liberi e proteine. La concentrazione di RNA è direttamente proporzionale alla fluorescenza rilevata e la quantità di RNA dei campioni viene ricavata estrapolandola da una retta di taratura, allestita utilizzando quantità note di uno standard costituito da una miscela di rRNA 16s e 23s.

Sono stati dosati 5 µl di ogni campione, in doppio, diluendoli 1:100 con buffer TE 1X (Tris/HCl 10mM, EDTA 1mM, pH7.5). La retta di taratura è stata allestita taratura utilizzando una miscela di rRNA (16S e 23S) appositamente diluita con buffer TE 1X in modo da ottenere i seguenti punti a concentrazione nota di 4 ng, 20 ng, 100 ng, 200 ng. Il RiboGreen è stato diluito 1:200 con buffer TE 1X e sono stati aggiunti 100 µl ad ogni campione. È stata effettuata un'incubazione di 5 minuti al buio e la fluorescenza dei campioni è stata rilevata alla lunghezza d'onda di 525 nm utilizzando uno spettrofluorimetro Victor Wallac 2 (PerkinElmer).

3.5.3 RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR)

I campioni sono stati retrotrascritti utilizzando il kit commerciale iScript cDNA Synthesis Kit della ditta BioRad. La quantità di RNA utilizzata per la reazione di retrotrascrizione è stata di 0,8-1 µg. È stato quindi calcolato il volume di campione

corrispondente alla quantità di RNA desiderata ed è stata preparata la miscela di reazione composta da:

- RNA templato
- Reaction Mix (4 µl per ogni campione)
- Trascrittasi inversa (1 µl per ogni campioni)
- Acqua fino a un volume totale di 20 µl

È importante preparare un controllo negativo per ogni campione, escludendo l'enzima trascrittasi inversa dalla miscela di reazione in modo che sia possibile valutare successivamente se è presente nel campione una contaminazione da DNA genomico.

La reazione di RT-PCR è stata effettuata utilizzando il seguente protocollo di reazione

Temperatura	Tempo
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min
4°C	∞

Il cDNA ottenuto è stato conservato a una temperatura di -20°C.

3.5.4 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La PCR è una metodica che permette di ottenere numerose copie di specifici segmenti di DNA a partire anche da minime quantità di DNA stampo. La PCR sfrutta l'attività polimerasica dell'enzima DNA-Polimerasi per l'amplificazione esponenziale del frammento d'interesse di DNA. L'enzima più frequentemente utilizzato è la Taq Polimerasi, una DNA-polimerasi termostabile, originariamente isolata dal *Thermophilus*

aquaticus, un archeobatterio termofilo che vive nelle sorgenti termali a temperature vicine a 100°C. La specificità dell'amplificazione è dovuta all'utilizzo di brevi oligonucleotidi sintetici (primers), complementari ai filamenti opposti del DNA dello specifico gene d'interesse da amplificare. La polimerasi quindi, partendo dai primers e in presenza dei quattro desossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs), è in grado di sintetizzare un nuovo filamento di DNA complementare utilizzando come stampo il singolo filamento, ottenuto dopo la denaturazione al calore delle molecole di DNA, del materiale di partenza. Ogni ciclo di duplicazione è composto da tre fasi consecutive strettamente dipendenti una dall'altra, condotte a temperature diverse e per tempi diversi:

- denaturazione
- appaiamento (annealing)
- allungamento

L'appaiamento, o annealing, dei primers allo stampo è una reazione di ibridazione DNA-DNA. La temperatura di annealing quindi può essere ampiamente modificata, in modo da creare le giuste condizioni di stringenza per ottenere la massima efficienza e correttezza di appaiamento al DNA stampo. La temperatura richiesta dipende dalla sequenza e dalla lunghezza dei primers ed essa è attualmente calcolata attraverso software specifici. In ciascun ciclo, tutto il DNA neosintetizzato funziona a sua volta da stampo per il ciclo di amplificazione successivo così che la quantità di DNA cresce in modo esponenziale durante tutta la durata della PCR. Il numero di cicli che compongono l'intera reazione può essere modificato in base alle esigenze ma solitamente è pari a 35-40 cicli di amplificazione successivi.

I campioni sono stati amplificati utilizzando una miscela di reazione composta da:

- DNA stampo 1 μ l
- PCR Buffer 10X 2,5 μ l
- MgCl₂ (50mM) 0,75 μ l
- dNTPs (10mM) 0,5 μ l
- Primer Forward (10 μ M) 0,5 μ l
- Primer Reverse (10 μ M) 0,5 μ l
- Taq Polimerasi (5 U/ μ l) 0,2 μ l
- Acqua DEPC 19,05 μ l

E'importante preparare un controllo negativo con la stessa miscela di reazione ma senza l'aggiunta del DNA stampo per verificare, al termine della reazione, che non vi sia contaminazione da acidi nucleici nei diversi componenti della miscela.

I campioni così preparati sono stati posti in un termociclatore e sono stati amplificati secondo il seguente protocollo di reazione:

35 CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
Denaturazione	2 minuti	95°C
Annealing	30 secondi	56 - 60°C
Allungamento	30 secondi	72°C
Denaturazione	30 secondi	95°C
Annealing	30 secondi	56 - 60°C
Annealing	30 secondi	72°C

Le sequenze dei primers utilizzati sono:

- CICLINA B (T_m 58°C): Forward 5' – TTGACTGCCGAGAAGTTGTG – 3'

Reverse 5' – CTGGCATT TTTGGAGAGGAAG – 3'

- β – ACTINA (T_m 58°C): Forward 5' – GCTCGTCGTCGACAACGGCTC – 3'

Reverse 5' – CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC – 3'

3.5.5 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi su gel è il metodo più comune per separare molecole di acidi nucleici di diversa dimensione, sfruttando il movimento di molecole cariche attraverso un campo elettrico. La corrente che attraversa il gel determina la migrazione delle molecole cariche negativamente, come il DNA, verso l'elettrodo positivo o anodo e di quelle cariche positivamente verso l'elettrodo negativo o catodo. La corsa elettroforetica avviene in gel di agarosio, un polisaccaride che forma un gel con pori variabili tra 100 e 300 nm di diametro, in base alla concentrazione utilizzata. Questo parametro influenza quindi la gamma di frammenti di DNA che sarà possibile separare con maggiore risoluzione. La tecnica dell'elettroforesi su gel di agarosio è spesso utilizzata per l'analisi dei prodotti della reazione di PCR. Grazie all'impiego di un marcatore di peso molecolare noto è infatti possibile monitorare la specificità dei primers utilizzati per l'amplificazione e la purezza del prodotto di amplificazione.

L'analisi dei prodotti di PCR è stata effettuata utilizzando un gel alla concentrazione pari a 1% (w/v) di agarosio, sciolto in tampone TAE (Tris/Acetato 0,04 M ed EDTA 0,0001 M). Alla miscela è stato aggiunto il bromuro di etidio (0,5 µg/ml), una sostanza in grado di intercalarsi al DNA ed emettere fluorescenza se irradiata da luce ultravioletta. I campioni, prima di essere caricati nei pozzetti del gel, sono stati miscelati al Loading Buffer, un tampone costituito da blu di bromofenolo 0,04% (w/v) che funge

da tracciante e da glicerolo 5% (v/v). Oltre ai campioni, nel gel è stato caricato anche uno standard, formato da una miscela di frammenti di DNA a massa molecolare nota. La corsa elettroforetica è stata condotta a voltaggio costante pari a 100 V. Terminata la migrazione, le bande corrispondenti ai frammenti di DNA, possono essere visualizzate mediante un transilluminatore a luce ultravioletta Gel-Doc della ditta BioRad, e successivamente analizzate con il programma Quantity One che permette di effettuare una valutazione densitometrica dell'intensità di fluorescenza emessa dalle bande di DNA.

3.5.6 REAL-TIME PCR

La real-time PCR è una tecnica molecolare che permette di effettuare una valutazione quantitativa dell'espressione di uno specifico gene di interesse all'interno di un campione biologico. Il principio su cui si basa è la misurazione della fluorescenza emessa da molecole che si legano al DNA in modo sequenza-specifico, come le sonde utilizzate nella metodica denominata Taqman, o da molecole non sequenza-specifiche come il SyberGreen. Nel primo caso la sonda è complementare alla sequenza del gene d'interesse e il suo legame al DNA provoca l'emissione di fluorescenza. Nel secondo caso, le molecole di SyberGreen emettono fluorescenza quando s'intercalano al DNA durante l'amplificazione. L'accumulo dei prodotti di PCR comporta di conseguenza un incremento della fluorescenza. Il ciclo di amplificazione che coincide con l'inizio dell'incremento esponenziale dei livelli di fluorescenza è chiamato ciclo soglia (Threshold Cycle o Ct). Il valore di Ct ottenuto è inversamente proporzionale alla quantità di template originariamente contenuta nel campione, infatti, maggiore è la quantità di template presente, prima si raggiunge il ciclo soglia. Esistono diversi metodi di quantificazione dell'espressione del gene d'interesse. La quantificazione assoluta

determina la concentrazione, in valore assoluto, della sequenza target nel campione. Questa quantità può essere ricavata paragonando il ciclo soglia del gene target con una curva standard allestita usando campioni a concentrazioni note. La quantificazione relativa invece, permette di esprimere i livelli d'espressione della sequenza target in relazione ad un campione denominato calibratore i cui livelli di espressione vengono paragonati a uno. L'accuratezza dell'esperimento può essere notevolmente incrementata normalizzando i valori ottenuti di espressione relativa del gene d'interesse con i valori di espressione relativa ottenuti per un gene housekeeper che dovrebbe mantenere la sua espressione invariata in diverse condizioni sperimentali e fra campioni diversi.

L'analisi dei dati è stata eseguita secondo il metodo $\Delta\Delta C_t$ (51) di quantificazione relativa, basato sulla presenza di:

- un campione calibratore, costituito da DNA template contenente una quantità, arbitrariamente fissata pari a uno, di ciascuno dei geni esaminati.
- un numero costante di copie di un gene housekeeper in tutti i campioni, finalizzato alla normalizzazione dei dati quantitativi.

L'efficienza delle reazioni di PCR per ciascuno dei geni in studio e per ciascuna coppia di primers, fondamentale per la validità del metodo di quantificazione, è stata ottenuta via software dal coefficiente angolare di una curva standard, allestita con diluizioni seriali di un campione di riferimento esprimente i geni d'interesse.

Le singole reazioni di Real Time PCR sono state allestite in una piastra da 96 pozzetti miscelando i seguenti reagenti:

- cDNA 10 ng
- primer Forward 100 nM
- primer Reverse 100nM

- Sybr Green Supermix, contenente: Sybr Green, Taq Polimerasi (0,6 U), MgCl₂ (3mM), tampone (Tris/HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8.4), dNTPs (200 μM)

I primers utilizzati sono stati i seguenti:

- p21^{cip1/waf1} (Tm 58°C): Forward 5' – CAGGTCCAGGGTCTTGGTCC – 3'

Reverse 5' – TGCAGACCGAGATCAATCCTCA – 3'

- rRNA S14 (Tm 58°C): Forward 5' – CAGGTCCAGGGTCTTGGTCC – 3'

Reverse 5' – CTCGGTGACAAAGTCGAAGT – 3'

La reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando un termociclatore (iCycler 5, BioRad) in grado di rilevare l'emissione di fluorescenza. Il protocollo di reazione è il seguente:

40 CICLI	TEMPO	TEMPERATURA
Attivazione	2 minuti	95°C
Denaturazione	30 secondi	95°C
Annealing	30 secondi	58°C
Allungamento	30 secondi	72°C
Allungamento finale	2 minuti	72°C

3.6 IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule sono state piastrate in piastre dal diametro di 35 mm alla densità di 2000 cellule per cm² per quelle trattate con DMSO 0,05% (v/v) e 4000 cellule per cm² per quelle invece trattate con reversina 5 μM per 24-48-72 ore. Al termine dei trattamenti, le cellule sono state fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% (w/v) per 10 minuti a temperatura ambiente. In seguito, è stata effettuata la permeabilizzazione delle cellule mediante PBS contenente Triton X-100 alla concentrazione di 0,2% (v/v) per 10 minuti

a temperatura ambiente. Le cellule sono state incubate per 30 minuti con PBS, albumina di siero bovino (BSA) alla concentrazione di 1% (w/v) e Triton X-100 allo 0,2% (v/v) (Blocking solution) per bloccare i siti di legame aspecifici. Sono stati poi aggiunti gli anticorpi primari, diluiti in blocking solution in base alle concentrazioni desiderate ed è stata effettuata un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente in agitazione.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti:

- Anticorpo anti-nucleo umano; diluizione 1:50 (Chemicon)
- Anticorpo anti β – tubulina; diluizione 1:200 (Sigma)

Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con PBS e incubate con i corrispondenti anticorpi secondari (Dako), coniugati con il fluoroforo TRITC, diluiti 1:200 in blocking solution, 2 ore a temperatura ambiente in agitazione al buio. Successivamente, le cellule sono state incubate con 10 $\mu\text{g/ml}$ di DAPI per 15 minuti a temperatura ambiente al buio e, dopo numerosi lavaggi con blocking solution, le immagini sono state acquisite mediante l'uso di un microscopio a fluorescenza (Olympus IX51), equipaggiato con una telecamera Hamamatsu 1394 e analizzate con uno specifico software per immagini.

3.7 ANALISI CITOGENETICA

L'analisi citogenetica è stata effettuata sulle cellule mantenute in coltura prima e dopo il trattamento con reversina 5 μM per 24-48-72 ore. Le cellule sono state trattate con Colcemid (10 $\mu\text{g/ml}$) prima di essere raccolte. Il Colcemid è simile alla colchicina ma meno tossico. La sua azione causa depolimerizzazione dei microtubuli e limita la formazione del fuso mitotico. In questo modo le cellule si arrestano in metafase ed è possibile utilizzarle per l'analisi dei cromosomi.

Le cellule sono state poi trattate con una soluzione ipotonica di cloruro di potassio 0,075 M e fissate con una soluzione di metanolo/acido acetico (3:1). I cromosomi sono stati analizzati mediante bandeggio QFQ (Q-Fluorescence-Quinacrine) e le immagini sono state acquisite mediante un microscopio a fluorescenza equipaggiato con una CCD camera (Leica). Tutte le analisi sono state condotte su almeno 70-100 metafasi per ogni campione.

CAPITOLO 4 - RISULTATI

4.1 EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON REVERSINA SULLA MORFOLOGIA CELLULARE

Gli effetti della reversina sulla morfologia cellulare sono stati testati su cellule tumorali delle linee di neuroblastoma SK-N-BE, fibrosarcoma HT-1080 e di cancro della cervice uterina HeLa. Colture primarie di fibroblasti umani di derma sono state utilizzate come cellule normali di controllo. I trattamenti sono stati effettuati inizialmente per 72 ore con reversina alla concentrazione 5 μ M, in quanto tali condizioni sono state impiegate in studi precedenti nei quali la molecola è stata utilizzata per indurre il dedifferenziamento cellulare (12). Il trattamento con reversina ha provocato una profonda modificazione della morfologia dei fibroblasti, che hanno assunto dimensioni cellulari 2-3 volte maggiori rispetto ai controlli trattati con DMSO, solvente della reversina, alla concentrazione pari allo 0,05%. Inoltre, le cellule sono risultate più adese alla superficie di coltura, e sono state osservate saltuariamente cellule polinucleate (Figura 4.1.1).

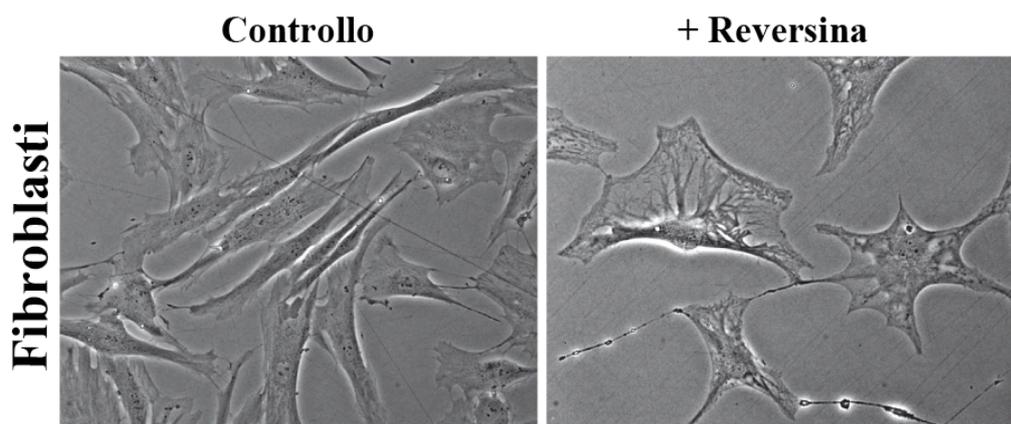


FIGURA 4.1.1: Fibroblasti umani di derma trattati con reversina 5 μ M per 72 ore

Lo stesso trattamento sulle cellule tumorali ha provocato, in tutti i casi, una marcata modificazione della morfologia cellulare, con l'aumento delle dimensioni cellulari e la

formazione di vacuoli intracitoplasmatici. Le cellule sono apparse polinucleate ed è stata osservata la presenza di micronucleazione. Come è possibile osservare in figura, dopo il trattamento con reversina 5 μ M le cellule tumorali appaiono rigonfie e mostrano brevi prolungamenti ed estroflessioni citoplasmatiche indici di stress cellulare (Figura 4.1.2).

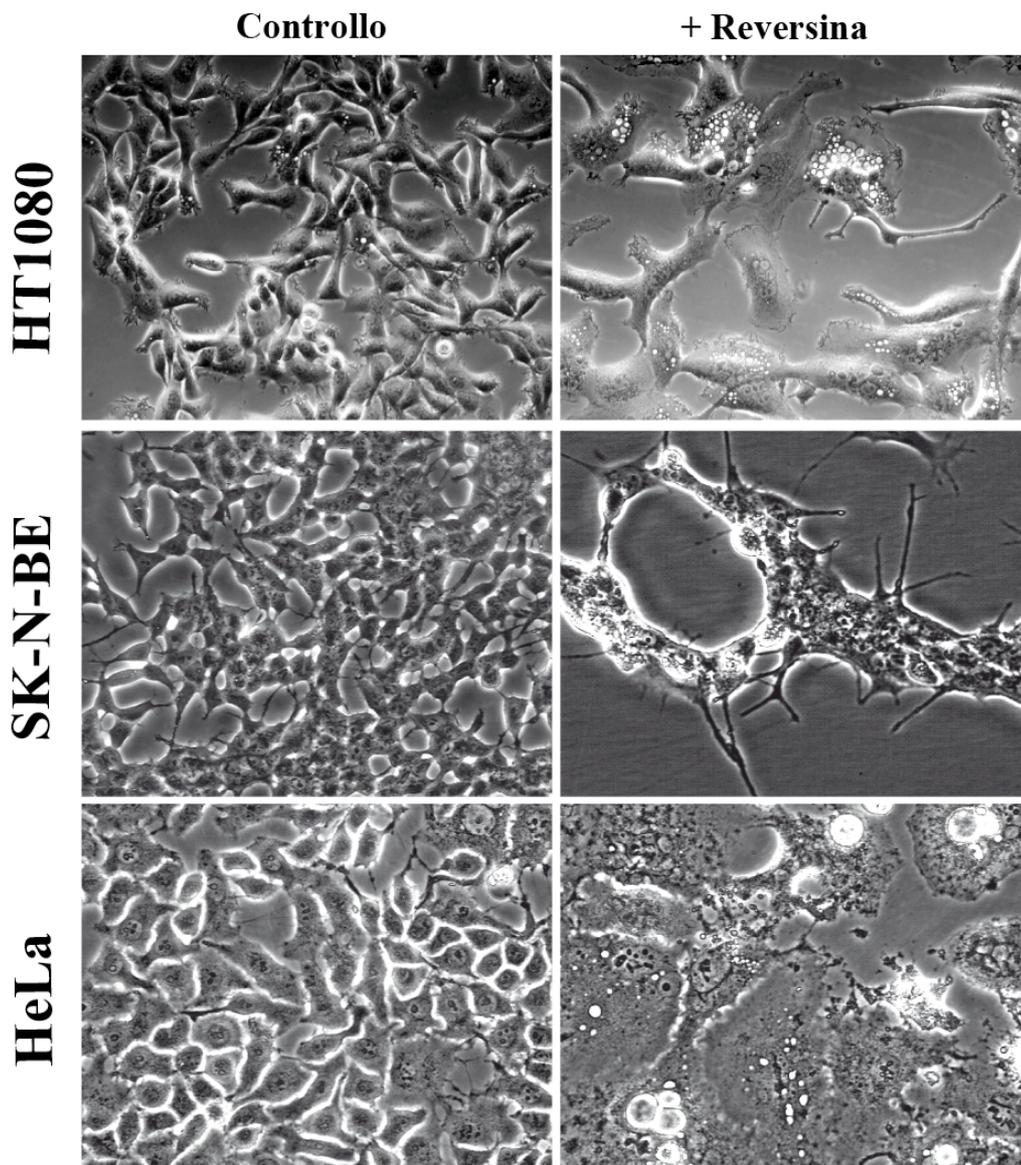


FIGURA 4.1.2: Cellule tumorali HT1080, SK-N-BE e HeLa trattate con reversina 5 μ M per 72 ore

4.2 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE E DELLA VITALITÀ CELLULARE DOPO TRATTAMENTO CON REVERSINA

Gli effetti sulla proliferazione e la vitalità cellulare delle linee tumorali, indotti dal trattamento con reversina, sono stati valutati mediante l'allestimento di curve di crescita in cui le cellule sono state contate con camera di Burker e colorante vitale Trypan blue dopo 1-2-3-4 giorni di trattamento con la molecola. I fibroblasti sono stati utilizzati come cellule normali di controllo. Il controllo interno dell'esperimento è stato preparato trattando le cellule con DMSO alla concentrazione pari a 0.05% (v/v), la stessa concentrazione utilizzata per dissolvere la reversina.

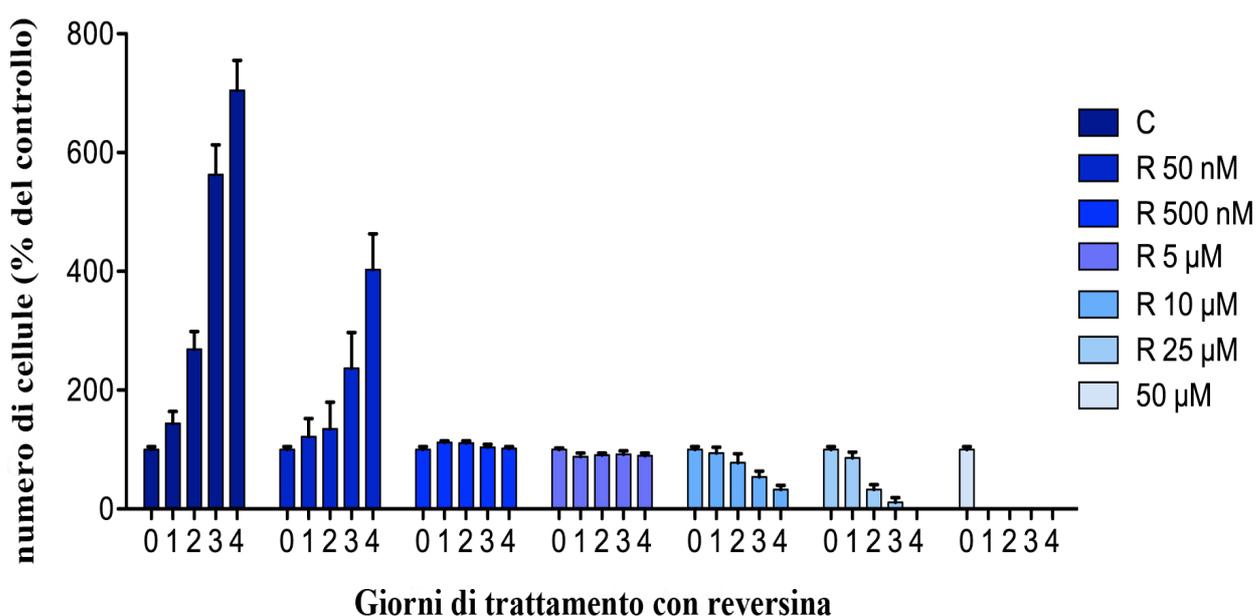


FIGURA 4.2.1: Effetti del trattamento con reversina sulla proliferazione di fibroblasti umani

Il trattamento con DMSO non influenza né la vitalità né la proliferazione cellulare che sono risultate paragonabili a quelle delle cellule non trattate. I fibroblasti umani sono stati trattati con differenti concentrazioni di reversina (50 nM – 50 µM) per 4 giorni. Il trattamento non risulta letale per i fibroblasti fino alla concentrazione di 5 µM,

concentrazione normalmente usata negli esperimenti di dedifferenziamento, con la vitalità cellulare sempre al di sopra del 97%. A questa concentrazione, come già osservato in precedenti lavori, la crescita cellulare è stata completamente arrestata e le cellule sono entrate in uno stato quiescente (12, 52). Concentrazioni di reversina superiori a 10 μM sono risultate tossiche per i fibroblasti, mentre trattamenti fino a 50 nM hanno provocato solo un rallentamento della proliferazione (Figura 4.2.1).

Il trattamento con reversina 5 μM delle cellule tumorali HeLa, HT1080 e SK-N-BE causa lo stesso effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare osservato sui fibroblasti normali. Tuttavia, è stata riscontrata una progressiva diminuzione del numero di cellule vitali, in particolare nel caso della linea SK-N-BE, che si riducono del 90% rispetto alle cellule controllo dopo 3 giorni di trattamento. Le cellule HeLa e HT1080 invece si riducono del 70% e 80% rispettivamente al quarto giorno di trattamento con la reversina 5 μM (Figura 4.2.2).

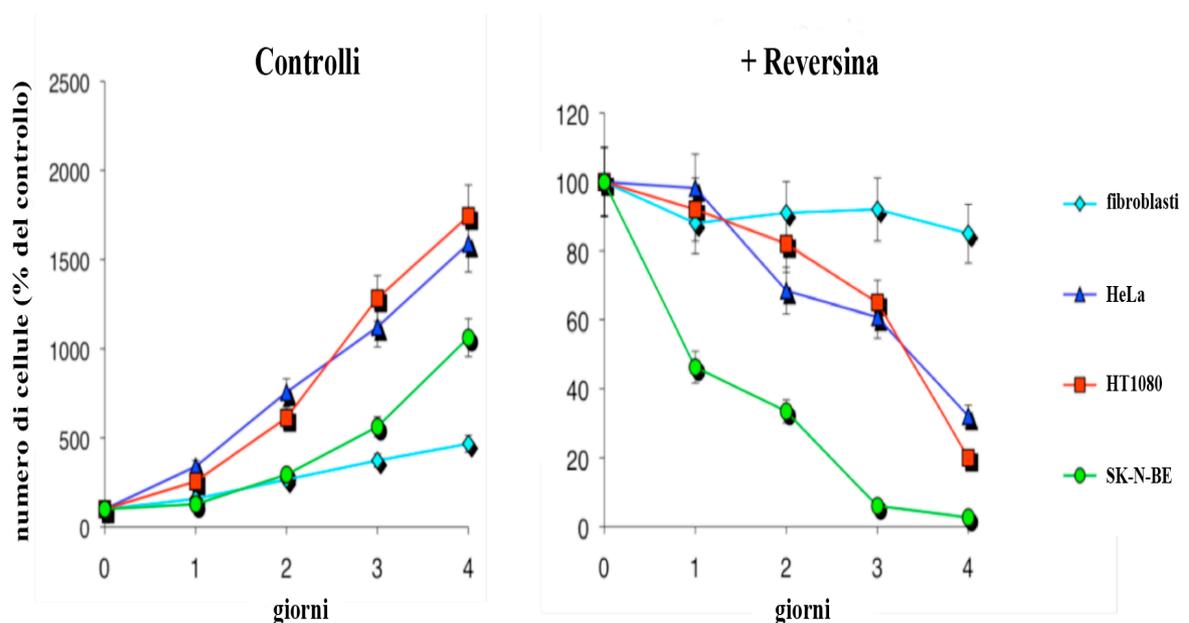


FIGURA 4.2.2: Effetti del trattamento con reversina 5 μM sulla proliferazione di cellule tumorali

È stato quindi possibile concludere che gli effetti di questa molecola sulla proliferazione e vitalità cellulare siano diversi su cellule normali o cellule tumorali, e siano tempo e dose dipendenti.

È stato inoltre dimostrato come gli effetti della reversina sui fibroblasti umani di derma siano reversibili. Infatti, dopo il trattamento di 4 giorni con reversina 5 μ M, che provoca inibizione della proliferazione nei fibroblasti e morte cellulare nelle linee tumorali, come mostrato in precedenza, la rimozione della molecola e la sua sostituzione con terreno di crescita fresco causa la lenta ripresa della proliferazione nei fibroblasti che, dopo circa 15-20 giorni dalla sospensione del trattamento, assumono una morfologia e una capacità proliferativa del tutto simile a quella dei fibroblasti normali non trattati. Al contrario, le cellule tumorali, non sono in grado di riprendere la crescita cellulare e la riduzione del numero di cellule vitali prosegue anche dopo 10 giorni dall'aggiunta di terreno di crescita completo senza reversina (Figura 4.2.3). La reversibilità degli effetti del trattamento con la molecola è stata quindi osservata solo nel caso delle cellule normali, suggerendo uno stretto legame tra il tipo cellulare e la modalità di azione della reversina.

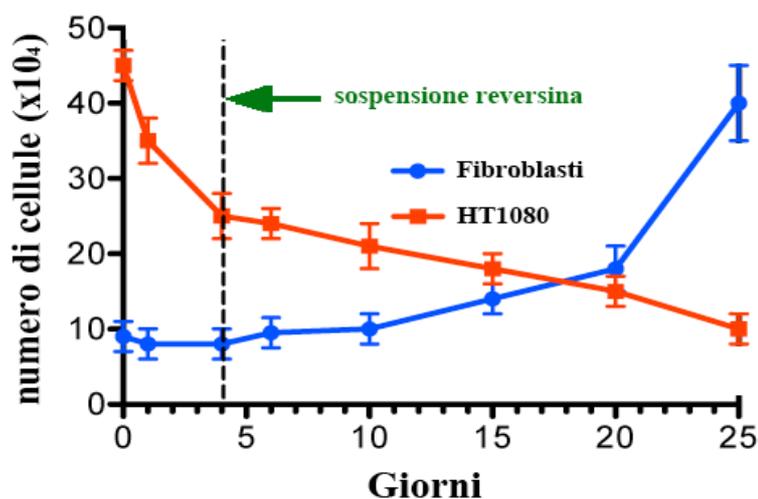


FIGURA 4.2.3: Effetto sulla proliferazione cellulare del trattamento con reversina dopo la sua sospensione

Infine, è stato dimostrato che il trattamento con reversina, nei fibroblasti umani di derma, è in grado di provocare la diminuzione dell'espressione della ciclina B in maniera tempo dipendente. Una parziale riduzione dei livelli di ciclina B è stata osservata dopo 4 giorni di trattamento con reversina 5 μ M fino alla sua totale scomparsa dopo 8 giorni di trattamento. Tuttavia, in seguito alla sospensione del trattamento con la molecola (25 giorni), i livelli di espressione della ciclina B ritornano paragonabili a quelli rilevati all'inizio del trattamento. Questo risultato conferma l'induzione del blocco della proliferazione cellulare dopo il trattamento con reversina 5 μ M in cellule umane normali e la sua reversibilità dopo la sospensione del trattamento (Figura 4.2.4).

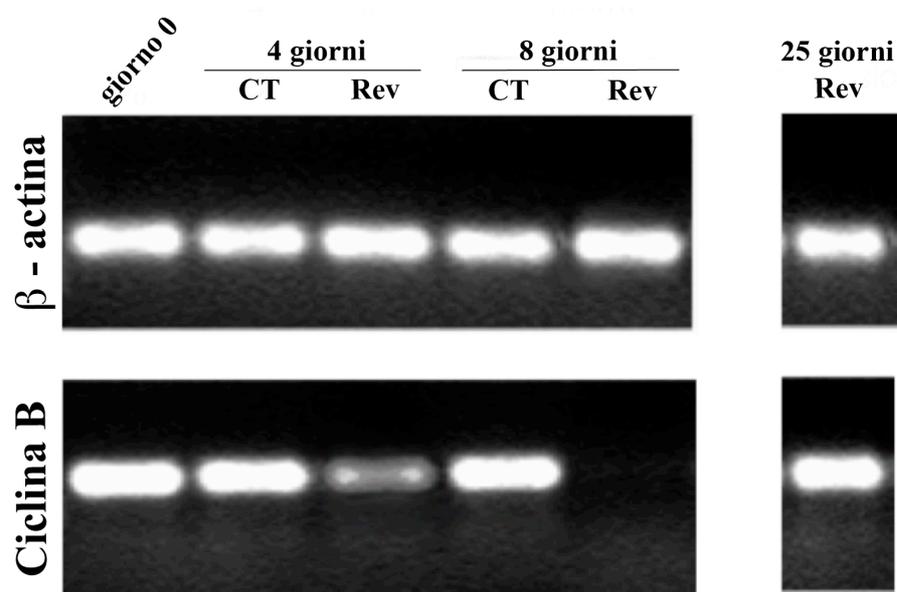


FIGURA 4.2.4: Analisi dell'espressione della ciclina B in fibroblasti umani trattati con reversina

4.3 ANALISI DEL CICLO CELLULARE MEDIANTE CITOFUORIMETRIA

A FLUSSO

Dopo aver dimostrato la capacità della reversina di indurre blocco della proliferazione in cellule umane normali e il blocco della proliferazione, associato a morte cellulare nel caso delle cellule tumorali, sono state eseguite diverse analisi del ciclo cellulare per

cercare di comprendere come il trattamento con reversina potesse influenzare la distribuzione delle cellule all'interno delle diverse fasi del ciclo cellulare. Le analisi sono state compiute giornalmente in cellule trattate con reversina 5 μ M per 3 giorni. Le cellule utilizzate come controllo sono state trattate con DMSO alla concentrazione di 0,05% (v/v). La citofluorimetria a flusso permette di distinguere popolazioni cellulari diploidi o tetraploidi e, in particolare, di discriminare cellule diploidi in fase G2/M dalle cellule tetraploidi in fase G1, riuscendo a quantificare le componenti delle due popolazioni che costituiscono il picco a contenuto di DNA 4n. L'analisi del ciclo cellulare ha mostrato l'esistenza di profili di distribuzione cellulare completamente diversi tra fibroblasti normali e cellule tumorali. Infatti, il trattamento dei fibroblasti causa la formazione di una popolazione poliploide già dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, raggiungendo un rapporto tra cellule diploidi e cellule tetraploidi pari a 60:40, rapporto che non cambia durante tutta la durata del trattamento con reversina 5 μ M. Da un'analisi citofluorimetrica approfondita, i fibroblasti umani normali risultano bloccati nelle fase G1 sia della popolazione diploide, che di quella tetraploide, testimoniato anche da un azzeramento della fase S già dopo soltanto 24 ore di trattamento con la molecola. Al contrario, le cellule tumorali rispondono in modo differente al trattamento con la molecola. Infatti, anche se il trattamento, come già osservato per i fibroblasti, porta alla formazione di una popolazione poliploide (che nel caso delle cellule HT1080 e HeLa rappresenta il 90% dell'intera popolazione cellulare), non si osserva alcun arresto del ciclo cellulare, ma si osserva un aumento delle popolazioni poliploidi, indice di endoreplicazione cellulare, dove il contenuto di DNA continua ad aumentare, senza che la cellula riesca a completare la citochinesi. In tutte le linee tumorali analizzate si osserva così la formazione di cellule dal contenuto di DNA anche superiore a 4N e la presenza di una popolazione tetraploide in fase G2.

Il trattamento con DMSO 0,05% (v/v), non provoca differenze significative nella distribuzione delle cellule all'interno delle diverse fasi del ciclo cellulare tra fibroblasti normali e cellule tumorali (Figura 4.3.1 A, 4.3.1 B)

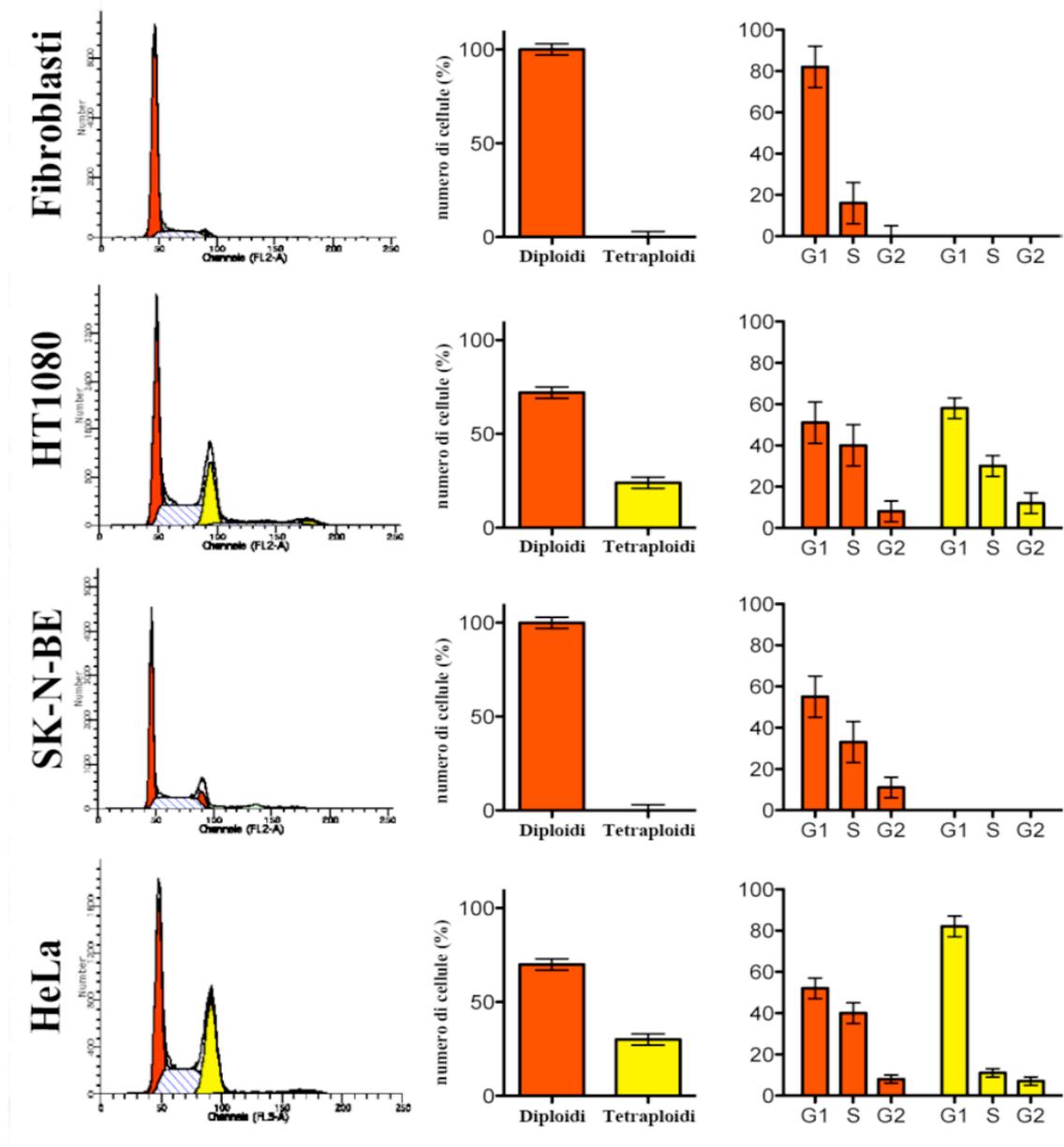


FIGURA 4.3.1 A: Analisi del ciclo cellulare nelle cellule controllo trattate con DMSO 0,05% (v/v) per 72 ore

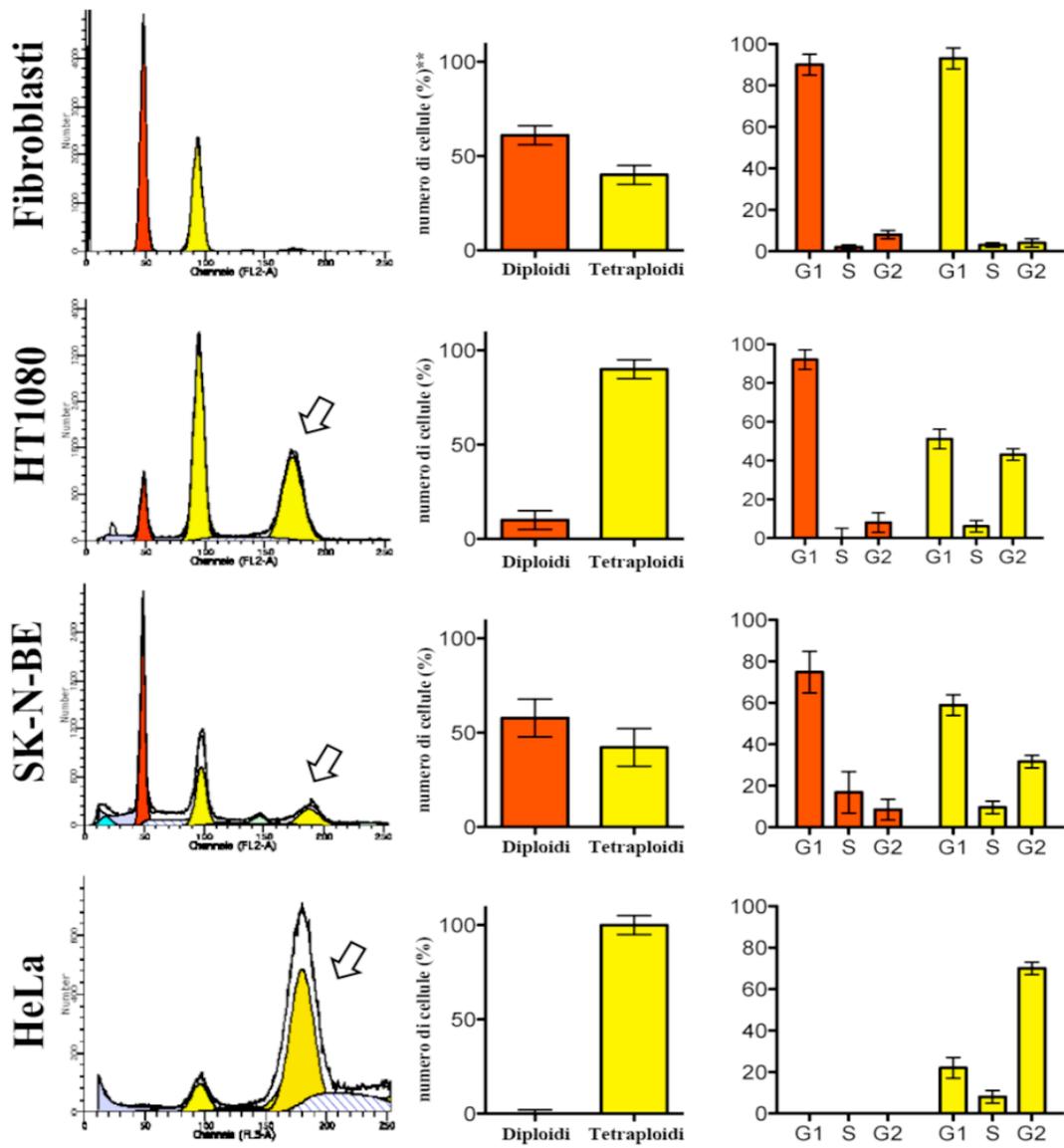


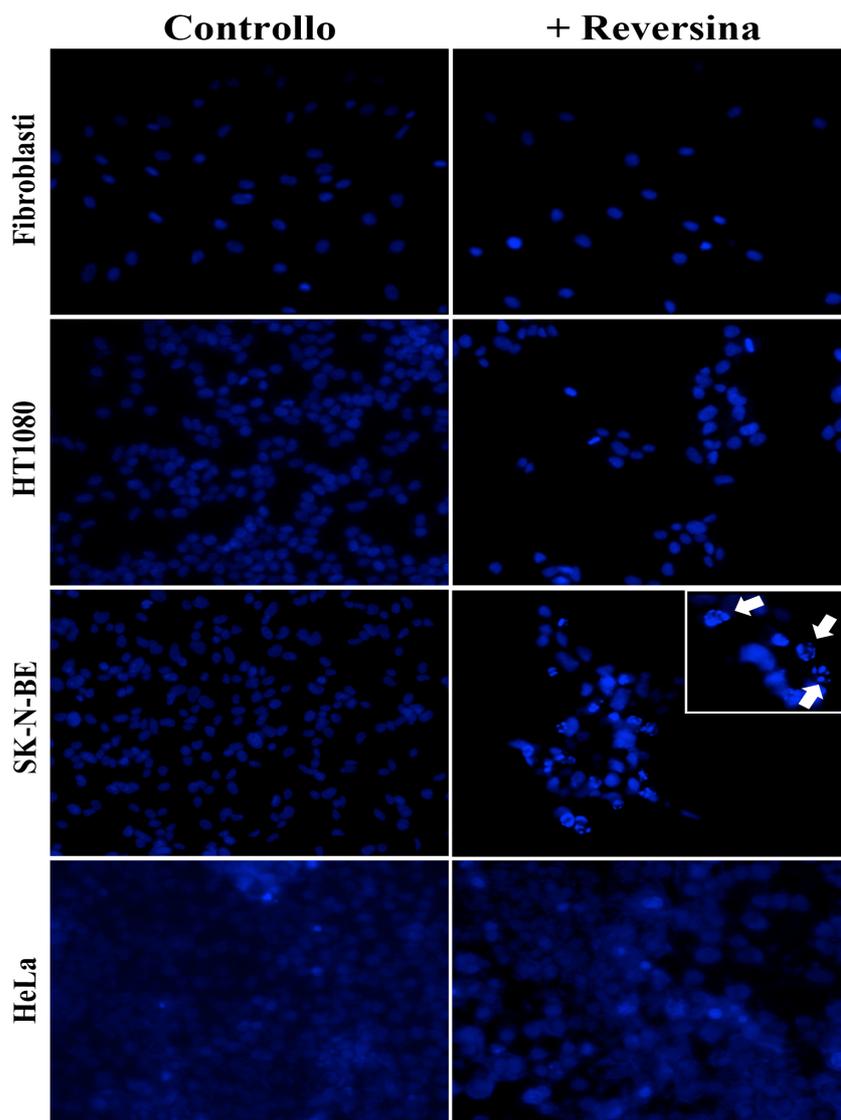
FIGURA 4.3.1 B: Analisi del ciclo cellulare dopo trattamento con reversina 5 μ M per 72 ore

4.4 STUDIO DEL MECCANISMO DI MORTE CELLULARE INDOTTO DAL TRATTAMENTO CON REVERSINA

Una volta dimostrato che il trattamento con reversina ha effetti diversi sulle cellule tumorali, dove induce endoreplicazione e morte cellulare, si è pensato di investigare il tipo di morte cellulare indotta dal trattamento. Lo studio del meccanismo di morte cellulare, attivato dalla reversina, è stato effettuato inizialmente attraverso: (a) colorazione con DAPI dei nuclei cellulari; (b) valutazione dell'attivazione della caspasi 3 effettrice mediante tre differenti approcci sperimentali.

4.4.1 COLORAZIONE NUCLEARE CON DAPI

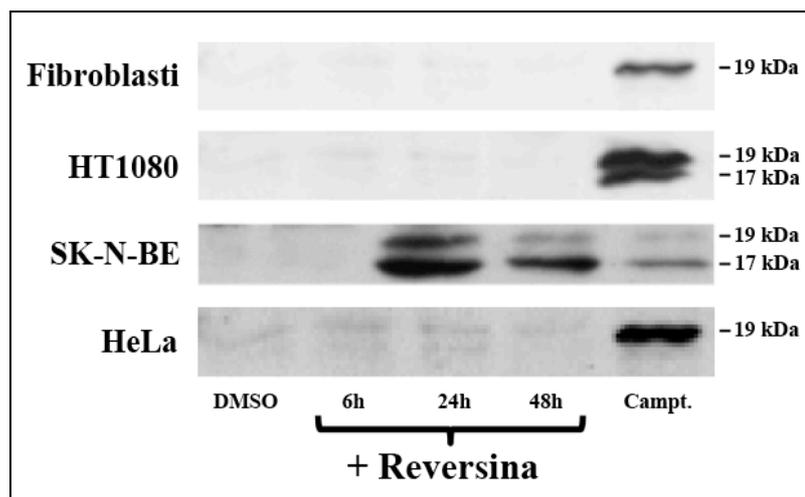
La colorazione con DAPI è stata effettuata in tutte le cellule trattate con reversina 5 μM e nelle cellule controllo trattate con DMSO 0,05% (v/v). Nonostante il trattamento con la molecola induca morte cellulare in tutte le cellule tumorali, solo nelle SK-N-BE trattate con reversina 5 μM è possibile osservare una significativa condensazione cromatinica, caratteristica tipica della morte cellulare per apoptosi. Negli altri casi, non sono state osservate particolari differenze tra controlli e cellule trattate con la molecola se non la formazione di cellule polinucleate dopo 72 ore di trattamento. I fibroblasti normali non mostrano alcuna differenza nucleare significativa tra cellule trattate o non trattate con la molecola (Figura 4.4.1)



[4.4.2 VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3 PER WESTERN BLOT](#)

Per stabilire se la morte cellulare osservata fosse dovuta all'attivazione del processo apoptotico, è stata valutata l'attivazione della caspasi 3 mediante Western blot. È stato utilizzato un anticorpo primario specifico per il frammento attivo della caspasi effettrice 3, il cui peso molecolare è di 17 kDa. L'analisi ha permesso di rilevare l'attivazione della caspasi 3 solo dopo 24 - 48 ore di trattamento con reversina 5 μ M nelle cellule SK-N-BE, mentre, nelle cellule trattate per breve periodo (6 ore) con la molecola e in

quelle controllo trattate con DMSO 0,05% (v/v) non è presente attivazione. Al contrario, nei fibroblasti normali e nelle cellule HT1080 e HeLa non è stata osservata attivazione della caspasi né in seguito a trattamento con reversina 5 μ M né dopo trattamento con DMSO 0,05% (v/v). Le cellule trattate con Camptotecina alla concentrazione pari a 4 μ g/ml sono state utilizzate come controllo positivo dell'attivazione della caspasi 3 e del processo apoptotico. Le bande rilevate corrispondono al peso molecolare atteso e la presenza di due frammenti del peso molecolare di 17 kDa e 19 kDa corrisponde alla formazione di due subunità attive della caspasi 3 (p17 e p18) in seguito al taglio proteolitico della procaspasi 3 (Figura 4.4.2).

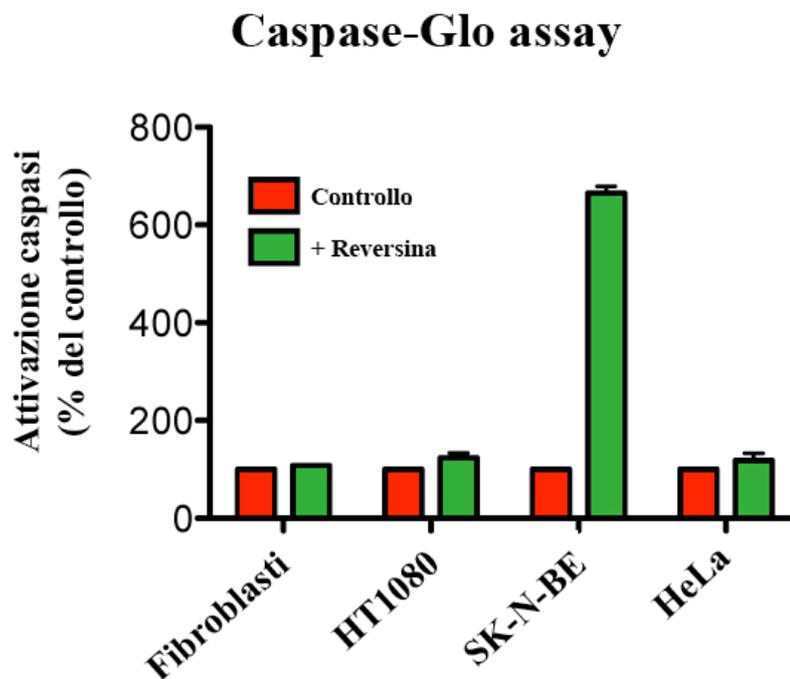


4.4.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLE CASPASI 3 E 7 CON SAGGIO IN LUMINESCENZA

Ulteriore conferma dell'induzione di morte cellulare per apoptosi da parte della reversina è stata ottenuta dall'analisi dell'attivazione delle caspasi 3 e 7 mediante un saggio in luminescenza (Caspase Glo® assay). Il principio alla base di questo kit è il clivaggio del substrato per opera della caspasi che provoca la liberazione di aminoluciferina, a sua volta substrato della luciferasi, la cui azione determina

l'emissione di luce che viene poi rilevata al luminometro. Il segnale che ne deriva è direttamente proporzionale al grado di attivazione delle caspasi.

Il trattamento con reversina 5 μ M delle cellule SK-N-BE provoca un'attivazione delle caspasi 3/7 di circa 6,5 volte superiore rispetto alle cellule controllo (DMSO 0,05%) dopo 24 ore di trattamento. Al contrario, come già rilevato mediante Western blot, la reversina non causa attivazione delle caspasi nei fibroblasti normali, nelle HT1080 e nelle cellule HeLa (Figura 4.4.3).



[4.4.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3 MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA FLUSSO](#)

L'attivazione della caspasi 3 nella linea cellulare SK-N-BE dopo trattamento con reversina è stata confermata anche mediante citofluorimetria a flusso. È stato utilizzato un anticorpo primario specifico per il frammento attivo della caspasi 3.

Il trattamento per 24 ore con reversina 5 μ M delle cellule SK-N-BE induce l'attivazione della caspasi 3 come è possibile osservare dal grafico. Nelle cellule controllo trattate con DMSO 0,05% (v/v) solo lo 0,25% degli eventi osservati mediante il citofluorimetro mostra positività per il frammento attivo della caspasi. Al contrario, dopo trattamento con la molecola la percentuale degli eventi positivi aumenta fino al 20,55% confermando ulteriormente l'attivazione della morte cellulare per apoptosi nelle cellule di neuroblastoma SK-N-BE (Figura 4.4.4)

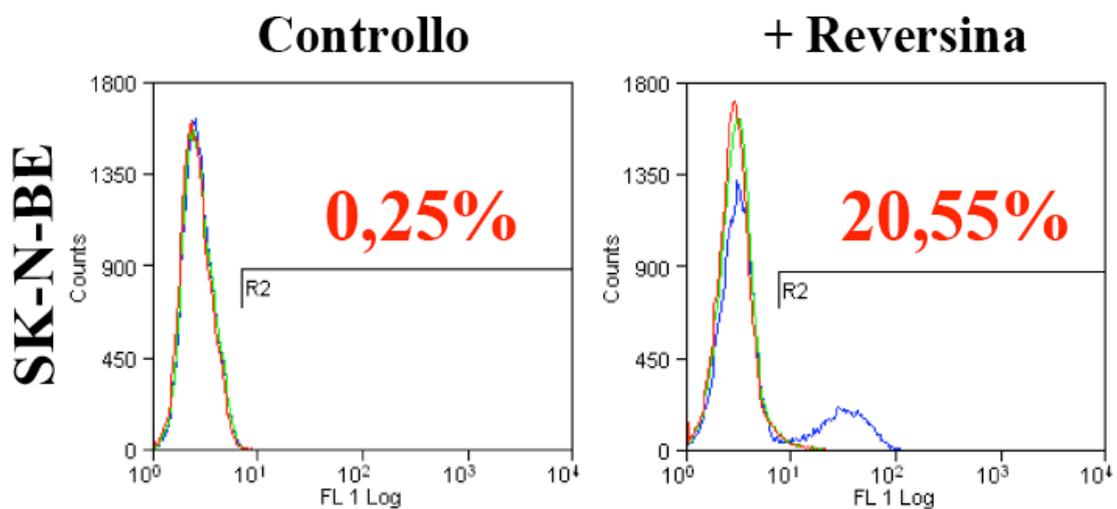


FIGURA 4.4.4: Analisi dell'attivazione della caspasi 3 dopo 24 ore di trattamento con reversina 5 μ M nelle cellule SK-N-BE

4.4.5 VALUTAZIONE DEL MECCANISMO DI MORTE CELLULARE INDOTTO DALLA REVERSINA IN CELLULE HT1080 E HELA

Dall'analisi del ciclo cellulare abbiamo osservato che la reversina, nelle cellule HT1080 e nelle cellule HeLa, determina la formazione di una popolazione cellulare poliploide preponderante sul numero totale delle cellule. Inoltre, la riduzione del numero cellulare, osservato in precedenza, dovuto al trattamento con la molecola non sembra dipendere

dall'attivazione del pathway apoptotico in queste cellule. Per valutare se questo effetto potesse dipendere da anomalie mitotiche, le cellule HT1080 e HeLa sono state trattate con DMSO 0,05% (controllo) o reversina 5 μ M per 72 ore e, in seguito, è stata effettuata l'analisi dell'apparato dei microtubuli mediante immunofluorescenza con un anticorpo primario specifico per la β -tubulina, componente costitutivo dei microtubuli, mentre la colorazione dei nuclei è stata effettuata con DAPI (Figura 4.4.5.1).

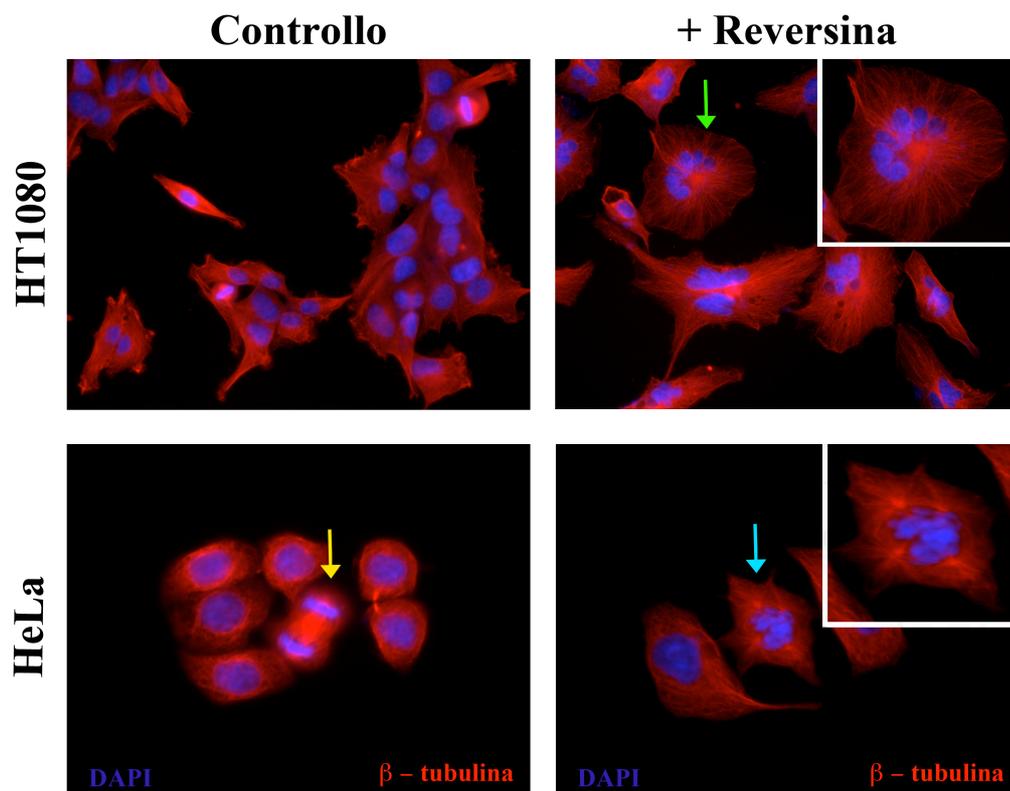


FIGURA 4.4.5.1: Immunofluorescenza anti β -tubulina e colorazione nucleare con DAPI

Le cellule trattate con DMSO 0,05% (v/v) mostrano caratteristiche morfologiche normali e nuclei di forma normale. Inoltre, è possibile identificare figure mitotiche normali in metafase (freccia gialla). Al contrario, in entrambe le linee cellulari trattate con reversina 5 μ M è possibile identificare un'alterata distribuzione dei microtubuli cellulari, in particolare, nelle cellule HT1080 assumono una distribuzione radiale a partire dai nuclei verso la periferia cellulare, dove prendono contatto con la membrana

plasmatica (freccia verde). Nelle cellule HeLa invece, sono facilmente identificabili centrosomi multipli da cui si diramano fasci di microtubuli (freccia azzurra). Inoltre, la colorazione con DAPI ha permesso di identificare numerosi micronuclei sia nelle cellule HT1080 che nelle cellule HeLa, marcatori tipici di mitosi aberranti causate dall'errata formazione del fuso mitotico e dell'endoreplicazione (53).

La comparsa di micronuclei nelle cellule HT1080 trattate con reversina è stata anche confermata mediante una doppia colorazione utilizzando un anticorpo anti-nuclei umani (rosso) e DAPI (blu). Il trattamento con reversina 5 μM per 72 ore causa l'aumento delle dimensioni cellulari e la formazione di numerosi micronuclei e nuclei plurilobati (Figura 4.4.5.2).

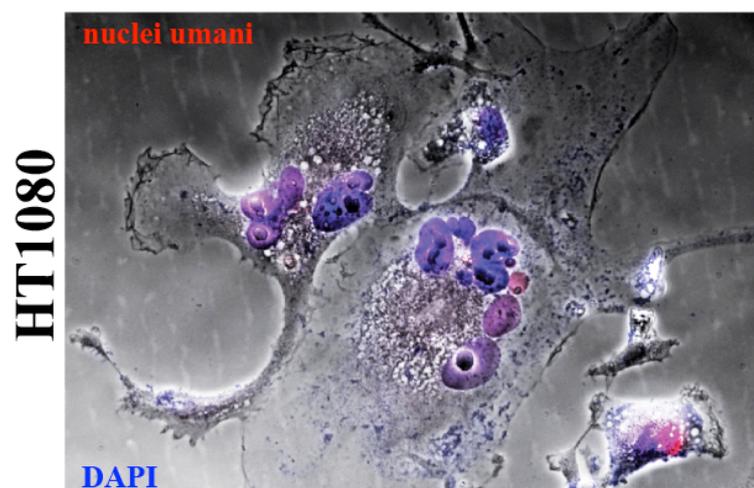


FIGURA 4.4.5.2: Immunofluorescenza anti-nuclei umani (rosso) e colorazione dei nuclei con DAPI (blu). La colocalizzazione è rappresentata dal colore viola

4.5 ANALISI CITOGENETICA DEL CONTENUTO DEI CROMOSOMI DOPO TRATTAMENTO CON REVERSINA

Dopo aver identificato la formazione di figure mitotiche aberranti e la micronucleazione, è stata effettuata un'analisi citogenetica dei cromosomi in cellule HT1080 ed SK-N-BE per verificare se il trattamento con reversina influenzasse anche il contenuto cromosomico

cellulare. Sono state quindi analizzate numerose metafasi dopo trattamento con reversina 5 μ M per 24 ore ed è stata effettuata la colorazione QFQ dei cromosomi.

L'analisi cromosomica delle cellule HT1080 trattate con DMSO 0,05% (v/v), utilizzate come controllo, ha mostrato un normale contenuto di 46 cromosomi nell'80% delle cellule mentre sono state riscontrate aneuploidie, tra 37 e 92 cromosomi, nel 20% delle metafasi (10% ipodiploidi e 10% ipertriploidi). Dopo 24 ore di trattamento con la molecola, le cellule hanno mostrato un incremento nell'aneuploidia, con un range tra 38 e 92 cromosomi nel 45% delle metafasi (11% ipodiploidi e 34% ipertriploidi). Tuttavia, il normale numero di 46 cromosomi è ancora presente nel 55% delle cellule trattate (Figura 4.5).

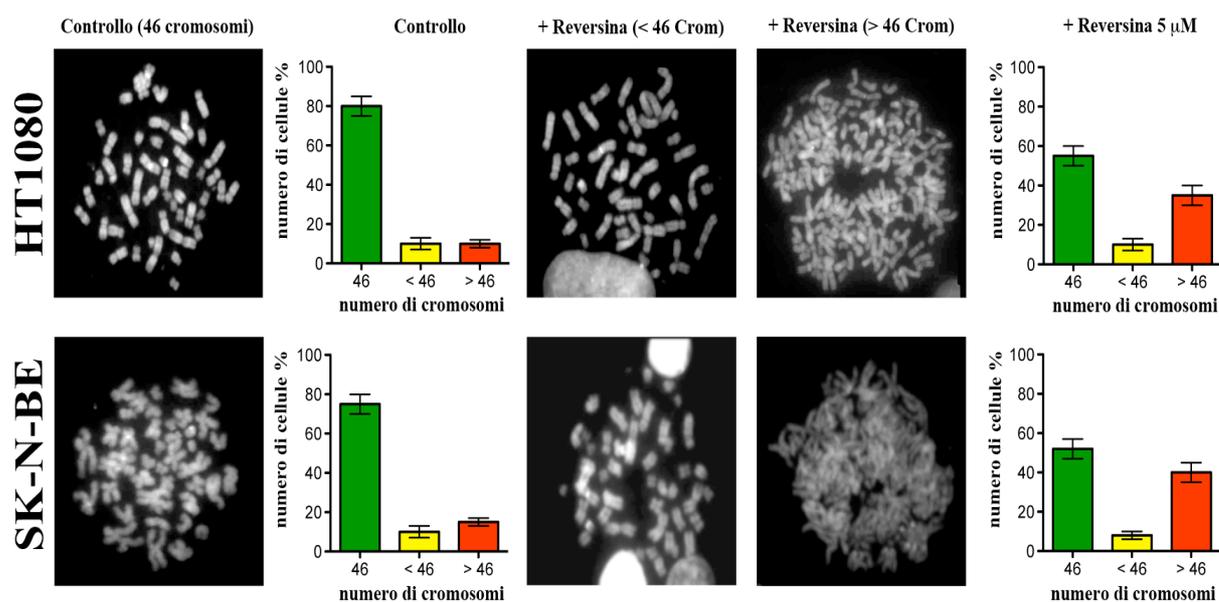


FIGURA 4.5: Analisi citogenetica delle cellule HT1080 e SK-N-BE dopo trattamento con reversina 5 μ M per 24 ore

L'analisi citogenetica delle cellule SK-N-BE trattate con DMSO 0,05% (v/v) e usate come controllo ha mostrato nel 75% delle metafasi un contenuto normale di 46 cromosomi mentre nel restante 25% (11% ipodiploidi e 14% ipertriploidi) è stata riscontrata la presenza di aneuploidie in un range compreso tra 43 e 73 cromosomi. Al

contrario, dopo 24 ore di trattamento con reversina 5 μ M, le cellule SK-N-BE hanno mostrato un incremento nella frazione di cellule aneuploidi che diventa del 46% (9% ipodiploidi e 37% ipertriploidi) con un intervallo del numero di cromosomi compreso tra 37 e 92. Il 54% delle metafasi analizzate presenta un numero normale di 46 cromosomi anche dopo il trattamento con la molecola (Figura 4.5).

4.6 ANALISI DEGLI EFFETTI DELLA REVERSINA SU FIBROBLASTI UMANI DOPO DEREGLAZIONE DEL PATHWAY DI P53

La reversina è in grado di interagire con diversi bersagli molecolari ed è noto essere responsabile del blocco della citocinesi sia in cellule normali che in cellule tumorali e di indurre endoreplicazione. Dall'analisi del ciclo cellulare è stato però possibile evidenziare un differente comportamento da parte di fibroblasti umani normali rispetto a diverse linee di cellule tumorali dopo il trattamento con la molecola. Per verificare se la differenza negli effetti della reversina esistente tra le due diverse popolazioni cellulari, in particolare il blocco nella fase G1 da parte dei fibroblasti e l'induzione di cicli di endoreplicazione nelle cellule tumorali, fosse riconducibile a un'alterazione dei checkpoint cellulari, è stata effettuata un'analisi degli effetti della reversina dopo l'alterazione di uno di questi checkpoint, nello specifico quello mediato da p53/p21^{Waf1/Cip1}. In particolare, è stata utilizzata pifitrina- α (PFT- α), un inibitore della trascrizione mediata dalla proteina p53.

4.6.1 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE E DELLA VITALITÀ CELLULARE DOPO TRATTAMENTO CON PIFITRINA- α E REVERSINA

I fibroblasti umani di derma sono stati trattati con pifitrina- α 10 μ M o con una combinazione di reversina 5 μ M e pifitrina- α 10 μ M. La vitalità cellulare è stata valutata tramite colorazione con colorante vitale Trypan Blue.

Il trattamento con solo pifitrina- α non ha provocato variazioni significative della proliferazione cellulare, e non sono presenti differenze morfologiche apprezzabili se paragonate con le cellule controllo trattate con DMSO 0,05% (v/v). Al contrario, il trattamento con reversina 5 μ M su fibroblasti pre-condizionati con pifitrina- α 10 μ M ha provocato una progressiva perdita cellulare che raggiunge circa il 40% dopo 6 giorni di trattamento combinato. Il trattamento con solo reversina, come mostrato in precedenza, ha causato un blocco della proliferazione senza induzione di morte cellulare (Figura 4.6.1).

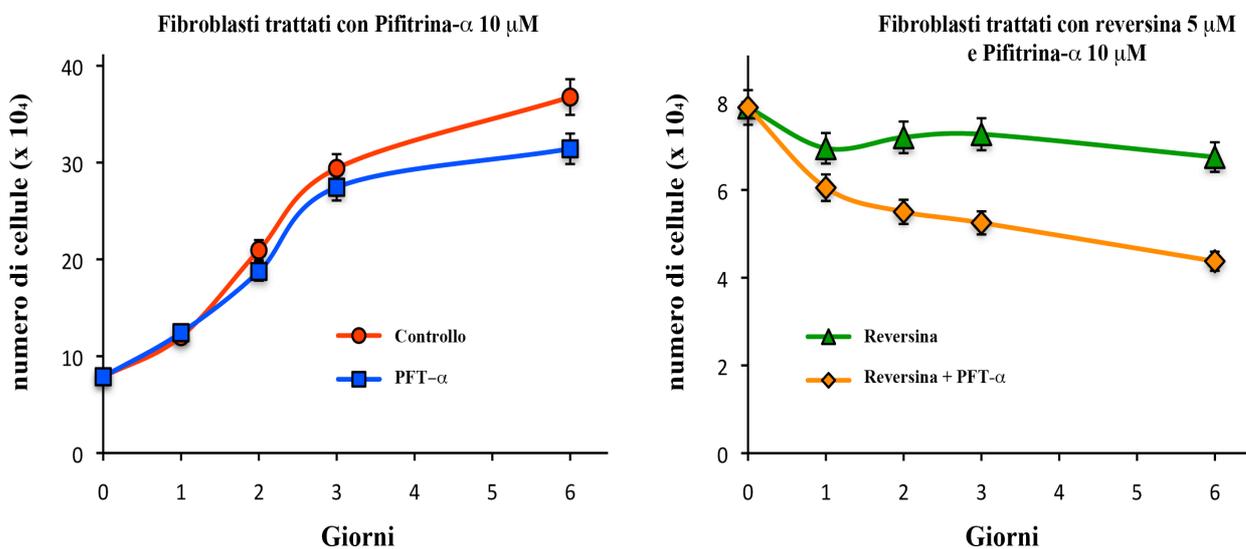


FIGURA 4.6.1: Curve di crescita di fibroblasti umani dopo trattamento con DMSO 0,05%, PFT- α 10 μ M, reversina 5 μ M e la combinazione di PFT- α e reversina (0 - 6 giorni)

4.6.2 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI P21^{Waf1/Cip1} PER REAL TIME PCR

È stata analizzata l'espressione di p21^{waf/Cip1} per Real-Time PCR nei fibroblasti umani di derma a diversi tempi di trattamento (6 e 12 ore) con le diverse molecole. Come è possibile osservare dal grafico in [Figura 4.6.2](#), il trattamento con reversina 5 μ M provoca un incremento di circa 2.5 volte nell'espressione di p21, potente inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti in grado di regolare la progressione nel ciclo cellulare, dopo 12 ore di trattamento nei fibroblasti umani normali. Al contrario, questo aumento non è stato rilevato dopo trattamento con la combinazione di reversina e PFT- α , confermando le previsioni data l'inibizione di p53, che è noto causare la down-regolazione dell'espressione di p21. L'utilizzo della sola PFT- α per 12 ore non provoca nessun cambiamento dei livelli della proteina che rimangono paragonabili a quelli delle cellule controllo trattate con DMSO 0,05% (v/v). Tempi brevi di trattamento con reversina 5 μ M (6 ore) non sono sufficienti per indurre l'aumento dell'espressione di p21 che rimane costante in tutti i diversi campioni ([Figura 4.6.2](#)).

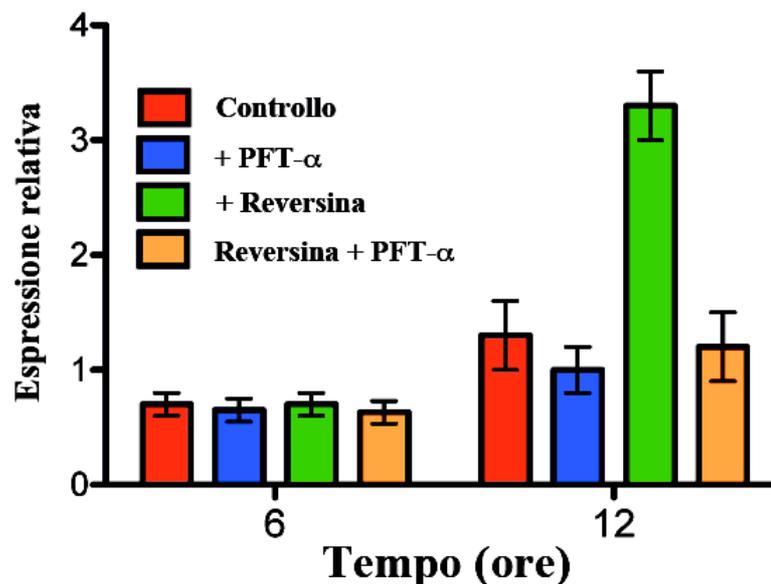


FIGURA 4.6.2: Livelli di espressione della proteina p21^{Waf1/Cip1} dopo trattamento con DMSO 0,05%, PFT- α 10 μ M, reversina 5 μ M e la combinazione di PFT- α e reversina per 6 – 12 ore valutati mediante Real-Time PCR

4.6.3 VALUTAZIONE DELLE MODIFICAZIONI NUCLEARI DOPO TRATTAMENTO CON REVERSINA E PIFITRINA- α

E' stata effettuata una colorazione nucleare con DAPI per valutare le modificazioni cellulari a livello nucleare nei fibroblasti normali dopo trattamento combinato con pifitrina- α 10 μ M e reversina 5 μ M per 72 ore. Il condizionamento dei fibroblasti con PFT- α ha determinato la formazione di micronuclei dopo trattamento con reversina come osservato in precedenza nelle cellule tumorali. La sola reversina non è in grado di indurre modificazioni nucleari così come il trattamento con DMSO 0,05% e PFT- α 10 μ M (Figura 4.6.3).

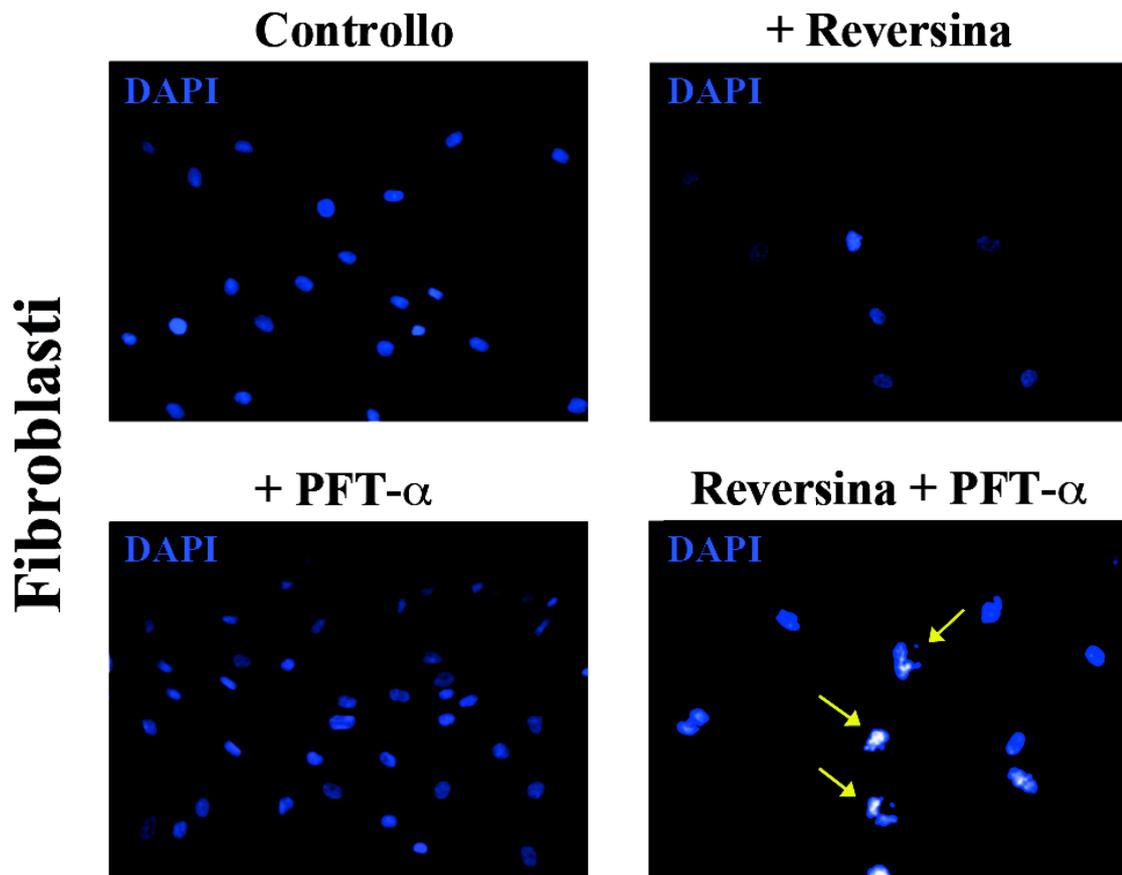


FIGURA 4.6.3: Colorazione nucleare con DAPI in fibroblasti umani di derma dopo trattamento con reversina 5 μ M o PFT- α 10 μ M e reversina 5 μ M per 72 ore

4.6.4 ANALISI DEL CICLO CELLULARE DOPO TRATTAMENTO CON REVERSINA E PIFITRINA- α

L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata su fibroblasti umani di derma dopo 72 ore di trattamento con solo pifitrina- α o con la combinazione di reversina 5 μ M e PFT- α .

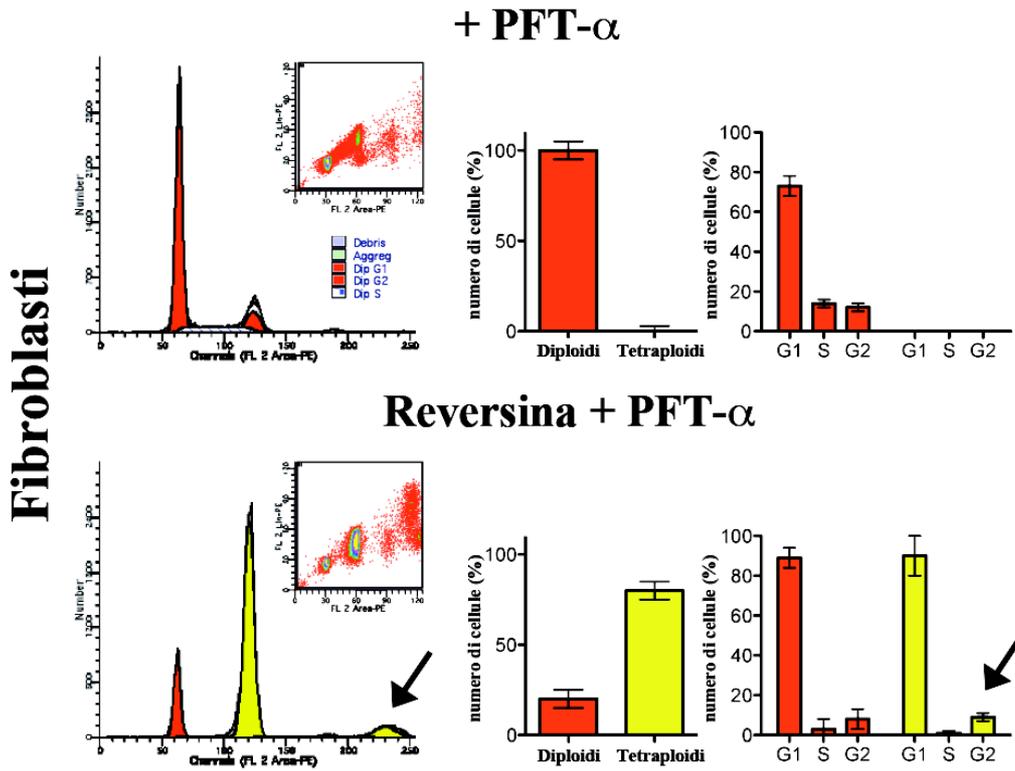


FIGURA 4.6.4: Analisi del ciclo cellulare in fibroblasti normali di derma dopo trattamento di 72 ore con PFT- α 10 μ M o reversina 5 μ M in associazione con PFT- α

L'utilizzo del solo inibitore di p53 non provoca alterazioni nella distribuzione delle cellule all'interno delle varie fasi del ciclo cellulare rispetto alle cellule controllo e non induce formazione di cellule tetraploidi. Al contrario, quando i fibroblasti pre-trattati con PFT- α sono stati trattati con reversina 5 μ M, è stato possibile osservare la formazione di una popolazione tetraploide predominante pari a circa l'80% della

popolazione cellulare totale. Inoltre, l'analisi della distribuzione delle cellule all'interno delle diverse fasi del ciclo ha permesso di identificare un aumento delle cellule tetraploidi nella fase G2, supportando l'ipotesi che i fibroblasti normali, precondizionati con PFT- α , subiscano endoreplicazione dopo esposizione alla reversina, al contrario di quelli trattati con la sola molecola mostrati in precedenza (Figura 4.6.4).

4.7 EFFETTI DELLA REVERSINA SU CULTURE PRIMARIE DI CELLULE STAMINALI TUMORALI DI GLIOBLASTOMA

Gli effetti della reversina sono stati anche testati su colture primarie di cellule staminali tumorali isolate da un glioblastoma. Il trattamento con la molecola alla concentrazione di 5 μ M per 72 ore ha provocato profonde modificazioni morfologiche e la progressiva riduzione del numero di cellule. Le cellule rimanenti mostrano chiari segni di stress cellulare tra cui la presenza di numerosi prolungamenti e vacuoli intra-citoplasmatici (Figura 4.7.1)

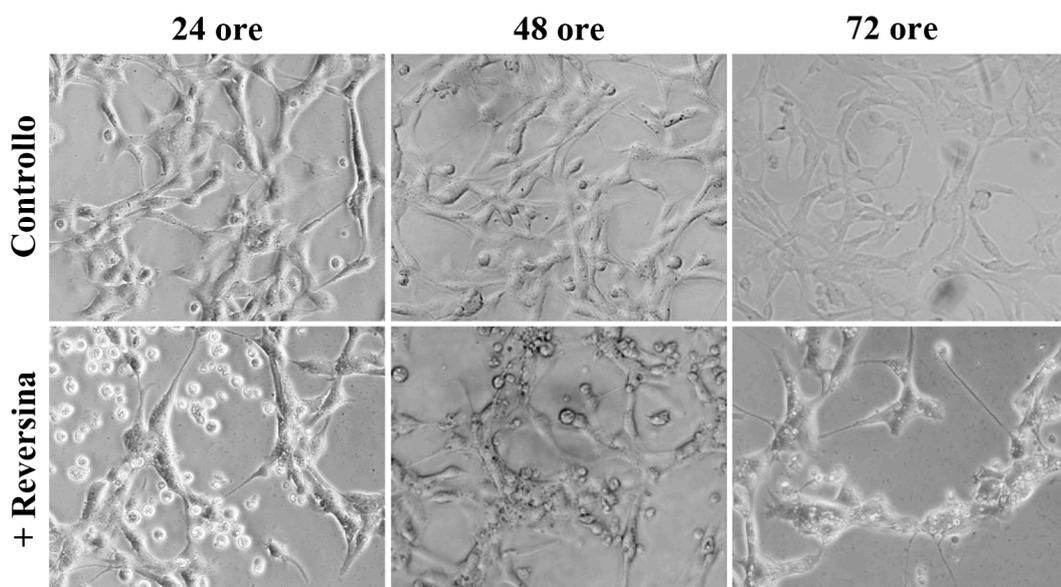


FIGURA 4.7.1: Effetti sulla morfologia e sul numero cellulare dopo trattamento con reversina 5 μ M per 72 ore su cellule staminali tumorali

È stata anche testato l'effetto della reversina sulla vitalità cellulare di queste cellule tumorali mediante l'utilizzo di un saggio colorimetrico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) che permette di valutare la citotossicità di un particolare composto in base all'attività mitocondriale, e quindi alla vitalità cellulare, presente nelle diverse cellule trattate.

Il trattamento con reversina 5 μM causa l'inibizione della proliferazione cellulare e una riduzione della vitalità cellulare pari all'85%, già dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, in confronto alle cellule utilizzate come controllo e trattate con DMSO 0,05% (v/v). È stato possibile anche osservare un'estesa induzione di morte cellulare (Figura 4.7.2).

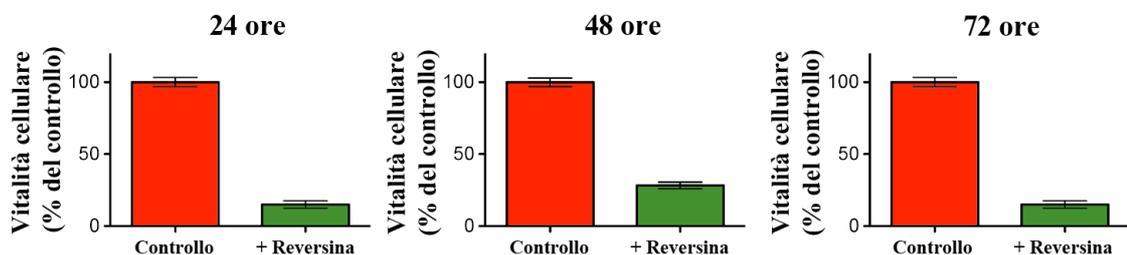


FIGURA 4.7.2: MTT test su cellule staminali tumorali trattate con reversina 5 μM o DMSO 0,05% (v/v) per 24-48-72 ore

Gli effetti del trattamento con reversina 5 μM sul ciclo cellulare delle cellule staminali tumorali sono stati valutati mediante citofluorimetria a flusso. Il trattamento con la molecola provoca la formazione di una popolazione cellulare tetraploide pari al 90% della totale popolazione cellulare, già dopo 24 ore dall'inizio del trattamento. Questa analisi conferma l'induzione, da parte della reversina, di endoreplicazione anche in questo tipo di cellule. È stato possibile anche riscontrare la presenza di numerosi detriti

cellulari dovuti all'estesa morte cellulare provocata dal trattamento con la molecola (Figura 4.7.3).

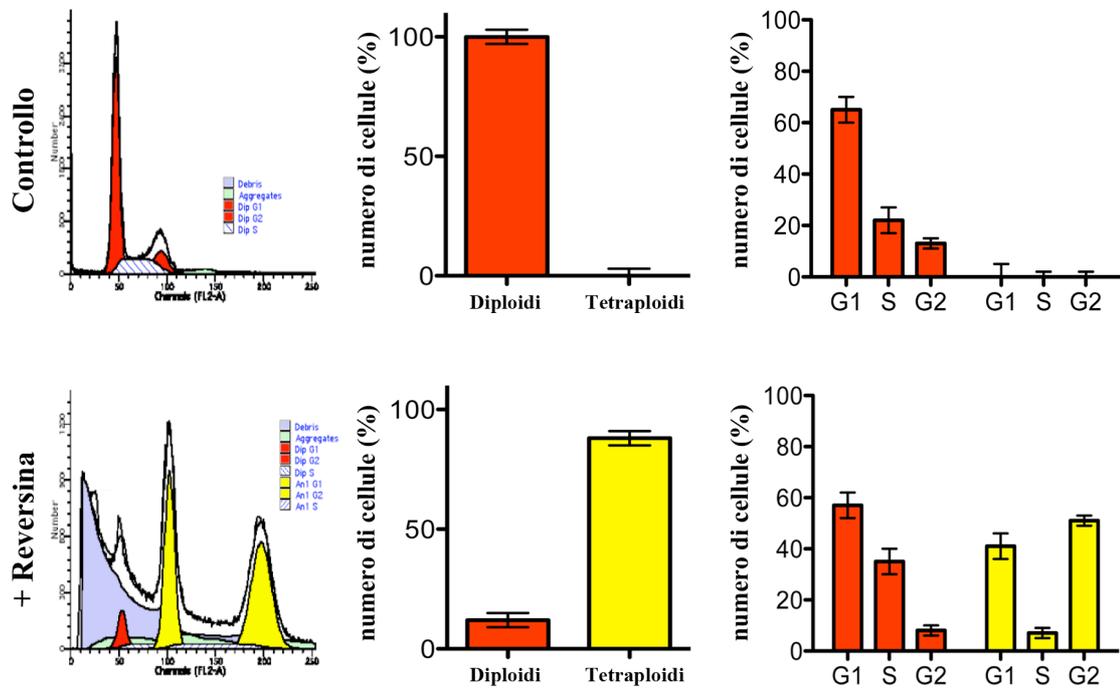


FIGURA 4.7.3: Analisi del ciclo cellulare di cellule staminali tumorali trattate con reversina 5 μ M per 24 ore. Le cellule di controllo sono state trattate con DMSO 0,05% (v/v)

CAPITOLO 5 -DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La reversina, purina sintetica isolata per le sue capacità come agente de-differenziante di cellule adulte a cellule simil-staminali, possiede effetti molto diversi quando utilizzata su cellule tumorali. Infatti, anche se la molecola aveva già mostrato che l'effetto di de-differenziamento era accompagnato da un'evidente inibizione della proliferazione cellulare, questo effetto si è rivelato reversibile dopo la rimozione della molecola dal terreno di coltura (12). Studi meccanicistici, con lo scopo di approfondire questo argomento, hanno mostrato che la molecola è in grado di inibire l'azione della protein-chinasi MEK1 e della miosina non muscolare di tipo 2 (NMMII), proteina del citoscheletro essenziale per la citocinesi. Questa doppia inibizione sembra essere responsabile dell'inibizione della crescita, ma è anche indispensabile per l'induzione del de-differenziamento (15). Tuttavia, questi risultati hanno generato alcune controversie poiché un successivo studio indipendente ha riportato che la sola inibizione di MEK1 e NMMII non sia in grado di indurre riprogrammazione cellulare (17). Al contrario, è stato dimostrato che gli effetti della reversina sono in parte dovuti alla sua attività inibitoria su diverse proteine della famiglia dell'Aurora chinasi (16, 17). In particolare, l'inibizione dell'Aurora B è essenziale per l'attività de-differenziante della molecola e per la capacità di bloccare le cellule nella fase G2/M del ciclo cellulare, giacché l'alterata attività di questa proteina è responsabile del fallimento della citocinesi (55). Nonostante queste evidenze, è stato mostrato che la sola inibizione della citocinesi non è sufficiente a spiegare gli effetti de-differenzianti della reversina. È stato anche ipotizzato che il rimodellamento della cromatina, indotto dalla defosforilazione della serina 10 dell'istone H3 da parte del trattamento con reversina, possa essere coinvolto nei processi di riprogrammazione. In realtà, gli stessi autori hanno rivalutato la loro ipotesi mostrando come la reversina sia un potente inibitore di MPS1, chinasi cruciale

nella regolazione del checkpoint mitotico e nell'orientamento dei cromosomi sul fuso mitotico, ed indicando questa proteina come il principale bersaglio della molecola (56). E' quindi evidente che la reversina agisca su molteplici bersagli molecolari, come osservato nei nostri laboratori in un precedente studio proteomico (52). Quindi, nonostante i numerosi tentativi, è evidente che il meccanismo d'azione della reversina rimanga tuttora da chiarire e, benché non sia stato completamente dimostrato che l'effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare sia legato alla capacità de-differenziante della molecola, questo effetto risulta importante se si immagina un possibile utilizzo della reversina come farmaco anti-tumorale.

In questo lavoro di tesi sono stati valutati gli effetti del trattamento della molecola su cellule normali (fibroblasti umani) e su cellule tumorali (cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE, cellule di fibrosarcoma umano HT1080 e cellule di carcinoma della cervice uterina HeLa). Alla concentrazione di reversina 5 μ M, che è quella normalmente utilizzata per indurre il de-differenziamento cellulare, i fibroblasti hanno mostrato un notevole aumento delle dimensioni cellulari e dell'adesione alla superficie di crescita. Inoltre, sono state osservate saltuariamente cellule polinucleate ([Figura 4.1.1](#)). L'utilizzo delle stesse condizioni di coltura sulle cellule tumorali ha provocato, oltre all'aumento delle dimensioni, la formazione di vacuoli intracitoplasmatici, di micronuclei e di cellule polinucleate. Le cellule sono apparse rigonfie e ricche di estroflessioni citoplasmatiche, segno di stress cellulare ([Figura 4.1.2](#)). Le modificazioni morfologiche osservate, unitamente alle alterazioni nucleari riscontrate, confermano l'ipotesi che la reversina sia in grado di influenzare la citocinesi e la divisione cellulare con la formazione di cellule dal volume notevolmente maggiore rispetto alle cellule controllo trattate con solo DMSO, solvente della reversina. La presenza di segni di stress cellulare e di cellule morte, nel caso delle linee tumorali, riscontrata in seguito

all'analisi morfologica dopo trattamento con reversina, ha suggerito l'idea di investigare gli effetti della molecola sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare. I dati ottenuti hanno evidenziato una sensibilità notevolmente maggiore al trattamento con reversina nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali. Infatti, nonostante esista una relazione diretta dose/tempo dipendente degli effetti della molecola, non è stata riscontrata nessuna riduzione significativa del numero cellulare nelle cellule normali alle concentrazioni di reversina normalmente utilizzate per il de-differenziamento (50 nM - 5 μ M). Solo concentrazioni di reversina superiori a 10 μ M sono risultate tossiche per i fibroblasti. Al contrario, nelle linee tumorali in esame, è stata osservata un'elevata induzione di morte cellulare in seguito al trattamento con la concentrazione 5 μ M di reversina. Inoltre, è stato mostrato che, dopo rimozione della reversina dal terreno di coltura, e mantenendo le cellule per un lungo periodo (15-20 giorni) in coltura con terreno senza la molecola, mentre i fibroblasti hanno ripreso lentamente a crescere, fino a ritornare ad una morfologia e proliferazione normali, tutte le linee tumorali sono andate incontro a una progressiva morte cellulare non reversibile. Questi risultati supportano l'ipotesi che la reversina sia in grado di provocare danni irreparabili nelle cellule tumorali che, una volta superata una certa soglia, non sono più in grado di riacquistare il loro "normale" fenotipo, andando incontro irreversibilmente a morte. È stato quindi investigato il meccanismo di morte cellulare indotto dalla molecola nelle linee tumorali, per cercare di chiarire quale fossero le cause di questa selettività, e dell'irreversibilità degli effetti. Dal confronto del ciclo cellulare delle cellule normali e di quelle tumorali dopo trattamento con reversina, si è visto come la molecola abbia effetti completamente diversi sui due tipi cellulari. Infatti, anche se in entrambi i casi la molecola porta ad un'inibizione della citocinesi e induce la cellula a rientrare nella fase G1 tetraploide del ciclo cellulare (endoreplicazione), le cellule normali si arrestano in

questa fase, perché i checkpoint cellulari sono funzionanti e portano ad un arresto reversibile del ciclo. Al contrario, l'analisi del ciclo cellulare delle linee tumorali trattate con la reversina ha evidenziato la presenza di cellule giganti poliploidi, caratterizzate dalla continua progressione all'interno delle diverse fasi del ciclo con conseguenti multipli cicli di endoreplicazione. Questa differenza di comportamento è molto probabilmente imputabile ad una de-regolazione dei checkpoint del ciclo cellulare, caratteristica comune a molte linee tumorali. Le cellule neoplastiche, infatti, non sono in grado di arrestare la progressione nel ciclo cellulare nonostante la presenza delle alterazioni durante la mitosi provocate dall'utilizzo della reversina. Al fine di valutare la veridicità di questa ipotesi, è stata approfondita la caratterizzazione del tipo di morte cellulare indotta dal trattamento con la molecola. Come mostrato nei risultati, solo nelle cellule SK-N-BE è stato possibile osservare la massiccia presenza di condensazione cromatinica, una delle caratteristiche principali della morte cellulare per apoptosi. I fibroblasti, sottoposti allo stesso trattamento, non mostrano apparenti cambiamenti della forma e della dimensione dei nuclei che appaiono normali, mentre, nelle cellule HT1080 e HeLa sono state riscontrate cellule polinucleate (Figura 4.4.1). Per confermare l'effettivo coinvolgimento della cascata apoptotica, è stata analizzata la presenza di attivazione di una delle caspasi effettrici dell'apoptosi, la caspasi 3. I risultati ottenuti, mediante differenti approcci tra cui Western Blot, citofluorimetria a flusso e saggio in luminescenza, hanno confermato l'attivazione della caspasi 3 nelle cellule SK-N-BE già dopo 24 ore dall'inizio del trattamento con reversina. Al contrario, fibroblasti normali non hanno mostrato attivazione della caspasi dopo trattamento con la molecola, come previsto, data l'assenza di riduzione nel numero di cellule ottenuta dall'analisi della proliferazione e della vitalità cellulare. Le altre due linee tumorali, HT1080 e HeLa, non sono caratterizzate dall'attivazione della caspasi. Queste evidenze

suggeriscono quindi il coinvolgimento di differenti pathway di morte cellulare in base al tipo di cellule prese in considerazione, in particolare, nelle cellule SK-N-BE è chiara l'attivazione del processo apoptotico. Al contrario, poiché nelle cellule HT1080 ed HeLa non è stata rilevata attivazione dell'apoptosi, sono state trovate cellule polinucleate e di dimensioni incrementate rispetto al controllo, e considerando il fatto che la reversina è in grado di interferire con proteine coinvolte nella divisione cellulare e nella corretta formazione del fuso mitotico, è stato ipotizzato che il trattamento con reversina di queste cellule potesse indurre morte cellulare per catastrofe mitotica. A sostegno di questa teoria, i risultati ottenuti dall'analisi per immunofluorescenza dei fusi mitotici, utilizzando un anticorpo primario anti β -tubulina, hanno mostrato che le cellule trattate con la molecola presentavano figure mitotiche anormali con una distribuzione radiale della β -tubulina, nel caso delle cellule HT1080, o la presenza di centrosomi multipli, nel caso delle cellule HeLa. Inoltre, per entrambe le linee cellulari tumorali è stato possibile dimostrare, mediante colorazione con DAPI e con un anticorpo in grado di riconoscere nuclei umani, la formazione di molteplici micronuclei.

Questa apparente differenza nella morte delle diverse linee cellulari dopo somministrazione della reversina, non è però dovuta a un diverso meccanismo d'azione della molecola. Infatti, in tutti i casi la molecola induce endoreplicazione non controllata, e formazione di cellule polinucleate. Durante l'arresto mitotico, in alcuni tipi cellulari, definiti "inclinati all'apoptosi" (apoptosis-prone), è necessaria la continua espressione di proteine anti-apoptotiche per impedire che la cellula attivi la cascata apoptotica (39). La condizione apoptosis prone dipende anche dagli oncogeni attivati, infatti, è stato dimostrato che in cellule di neuroblastoma, l'amplificazione di N-myc contribuisca a sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da farmaci (per esempio attraverso TRAIL o FasL). Le cellule che sopravvivono in queste condizioni sono

invece definite “apoptosis reluctant”. In questo caso, la sola inibizione della trascrizione non è sufficiente a innescare la cascata apoptotica. Quindi, le cellule SK-N-BE possono essere considerate cellule apoptosis prone, poiché il trattamento con reversina induce rapidamente attivazione delle caspasi e quindi morte cellulare tramite apoptosi. Alla categoria delle cellule apoptosis reluctant appartengono invece le cellule HT1080 ed HeLa, dove la molecola è in grado di stimolare endoreplicazione, formazione di cellule allargate ricche di micronuclei e difettosa segregazione cromosomica, tutte caratteristiche tipiche del processo di morte cellulare per catastrofe mitotica in assenza di attivazione del processo apoptotico (45). L’alterata segregazione cromosomica è stata confermata dall’analisi citogenetica delle cellule SK-N-BE ed HT1080 trattate con reversina 5 μ M per 72 ore. Dopo aver dimostrato l’induzione di meccanismi di morte cellulari differenti in base al tipo cellulare considerato, abbiamo focalizzato l’attenzione sull’approfondimento delle possibili motivazioni alla base dell’apparente selettività della reversina per le cellule tumorali. In particolare, è stata testata l’ipotesi secondo cui la presenza di checkpoint del ciclo cellulare funzionanti nelle cellule normali sia responsabile della mancata induzione di endoreplicazione e conseguente morte cellulare dopo il trattamento con la molecola.

L’analisi del ciclo cellulare ha permesso di evidenziare che una delle principali caratteristiche dei fibroblasti normali dopo trattamento con reversina è rappresentata dal blocco in fase G1. Per questo motivo, è stata utilizzata una molecola, la pifitrina- α , in grado di inibire l’espressione p53-dipendente di alcuni geni chiave nella regolazione di questo checkpoint come, ad esempio, p21. Il trattamento combinato con pifitrina- α 10 μ M e reversina ha permesso di aumentare la sensibilità dei fibroblasti al trattamento con la molecola. Si è osservato che il trattamento con reversina, combinato all’inibizione della via di p53-p21, causa la riduzione progressiva del numero cellulare anche nei

fibroblasti umani. Il trattamento con la sola pifitrina- α non influenza la normale proliferazione cellulare dei fibroblasti mentre il trattamento con reversina 5 μ M induce il blocco della proliferazione già osservato in precedenza. Inoltre, il pre-trattamento con pifitrina- α permette alla reversina di indurre endoreplicazione anche nelle cellule normali, come dimostrato dall'analisi del ciclo cellulare per citofluorimetria. Questi esperimenti d'inibizione dimostrano come l'attivazione dei checkpoint della fase G1 del ciclo cellulare prevengano l'induzione di endoreplicazione e di morte cellulare da parte della reversina. Le cellule normali sono in grado di controllare questi effetti mediante il blocco del ciclo cellulare in fase G1, dovuto anche all'induzione dell'espressione di p21 da parte della stessa reversina. Quando invece il checkpoint è deregolato o inefficiente, come avviene spesso in cellule di origine neoplastica, si ha una continua progressione all'interno del ciclo cellulare, con conseguente accumulo di mitosi aberranti, fino a raggiungere uno stato di alterazione tale per cui l'unica risposta possibile è l'induzione di morte cellulare.

Infine, per validare ulteriormente i nostri risultati, sono stati valutati gli effetti della reversina anche su una coltura primaria di cellule staminali tumorali, derivate da un glioblastoma, uno tra i tumori più aggressivi e farmaco-resistenti. Sorprendentemente, i risultati ottenuti hanno mostrato come la molecola sembra essere maggiormente attiva su questa popolazione cellulare rispetto alle linee tumorali studiate in precedenza, sia in termini di riduzione della proliferazione e della vitalità cellulare, sia in termini di induzione di endoreplicazione e morte cellulare.

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano le ragioni meccanicistiche del differente comportamento della reversina su cellule normali e cellule tumorali, suggerendo l'esistenza di un importante grado di selettività della molecola nei confronti di cellule di origine neoplastica. In conformità a questi risultati incoraggianti è tuttavia necessario

testare la tossicità e l'efficienza di questa molecola *in vivo* prima di poter ipotizzare un uso della reversina come possibile agente chemioterapico.

BIBLIOGRAFIA

1. Brockes J.P. *Science* 1997, 276: 81-87
2. Takahashi K, Yamanaka S. *Cell* 2006, Aug 25, 126(4): 663-676
3. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105: 2883-2888
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. *Cell* 2007, 131: 861-872
5. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. *Nature* 2007, 448: 313-317
6. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S et al. *Science* 2007, 318: 1917-1920
7. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K et al. *Nat Biotechnol* 2009, 27: 743-745
8. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. *Cell Stem Cell* 2009, 4(5): 381-384
9. Rosania GR, Chang YT, Perez O, Sutherlin D, Dong H, Lockhart DJ, et al. *Nat Biotechnol* 2000, 18(3): 304-308
10. Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. *J Am Chem Soc* 2004, 126(2): 410-411
11. Lee EK, Bae GU, You JS, Lee JC, Jeon YJ, Park JW, et al. *J Biol Chem* 2009, 284(5): 2891-2901
12. Anastasia L, Sampaolesi M, Papini N, Oleari D, Lamorte G, Tringali C et al. *Cell Death Differ* 2006, 13(12): 2042-2051
13. Saraiya M, Nasser R, Zeng Y, Addya S, Ponnappan RK, Fortina P, Anderson DG, Albert TJ, Shapiro I, MV Risbud, *Tissue Engineering* 2010, 16(4): 1443-1455
14. Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Himaki T, Yoshida M, Sato M, *J Reprod Dev* 2010, 56: 291-296
15. Chen S, Takanashi S, Zhang Q, Xiong W, Zhu S, Peters EC, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104(25): 10482-10487
16. D'Alise AM, Amabile G, Iovino M, Di Giorgio FP, Bartiromo M, Sessa F, et al. *Mol Cancer Ther* 2008, 7(5): 1140-1149
17. Amabile G, D'Alise AM, Iovino M, Jones P, Santaguida S, Musacchio A, Taylor S and Cortese R, *Cell Death Differ* 2009, 16: 321-330
18. Shan SW, Tang MK, Chow PH, Maroto M, Cai DQ, Lee KK. *Proteomics* 2007, 7(23): 4303-4316
19. Hsieh TC, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Wu JM. *Int J Oncol* 2007, 31(6): 1293-1300
20. Loka W, Kleinb RQ and Saifa MW, *Anti-cancer Drugs* 2010, 21: 339-350
21. van den Heuvel S. *WormBook* 2005: 1-16
22. Chang B, Broude EV, Fang J et al. *Oncogene* 2000, 19: 2165-2170

23. Burhans WC, Heintz NH *Free Radical Biology & Medicine* 2009, 47: 1282-1293
24. Nakanishi M, Shimada M and Niida H *Cancer Sci* 2006, 97(10): 984-989
25. Grafi G *Exp Cell Res* 1998, 244(2): 372-378
26. Knudsen ES, Knudsen KE *Exp Biol Med* 2006, 231(7): 1271-1281
27. Vousden KH and Prives C *Cell* 2009, 137: 413-431
28. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A et al *Drug Resist Updat* 2007, 10(1-2): 13-29
29. Ciliberto A, Shah JV *The EMBO Journal* 2009, 28: 2162-2173
30. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW *Nat Rev Cancer* 2005, 5(10): 773-785
31. Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O and Irimie A *Acta Oncologica* 2009, 48: 811-821
32. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J et al. *Cell Death and Differ* 2009, 16: 3-11
33. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G *Clin Cancer Res* 2005, 11(9): 3155-3162
34. Cotter TG *Nat Rev Cancer* 2009, 9(7): 501-507
35. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E et al *Gerontology* 2008, 54(2): 92-99
36. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK *Oncogene* 2001, 20: 2122-2133
37. Fulda S, Debatin KM *Oncogene* 2006, 25(34): 4798-4811
38. Glick D, Barth S, Macleod KF *J Pathol* 2010, 221: 3-12
39. Golstein P, Kroemer G *Trends Biochem Sci* 2007, 32(1): 37-43
40. Hayflick L, Moorhead PS *Exp Cell Res* 1961, 25: 585-621
41. Pazolli E and Stewart SA *Current Opinion in Genetics & Development* 2008, 18: 42-47
42. Roninson IB, Broude EV, Chang BD *Drug Resist Updat* 2001, 4: 303-313
43. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B *Cell Death and Differ* 2008, 15: 1153-1162
44. Ivanov A, Cragg MS, Erenpreisa J, Emzinsh D, Lukman H, Illidge TM *J Cell Sci* 2003, 116(20): 4095-4106
45. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R and Kroemer G *Oncogene* 2004, 23: 2825-2837
46. Lock RB, Stribinskiene L *Cancer Res* 1996, 56(17): 4006-4012
47. Portugal J, Bataller M, Mansilla S *Tumori* 2009, 95: 409-421

RINGRAZIO

- Il Prof. *Guido Tettamanti* per aver stimolato con i suoi preziosi consigli la mia attività di ricerca
- La Proff.ssa *Paola Viani* per avermi dato la possibilità di conseguire questo titolo e per essermi stata da guida nei momenti d'insicurezza
- Il Prof. *Luigi Anastasia* per l'aiuto, la pazienza e il supporto che mi ha offerto durante questo percorso e per la fiducia dimostratami anche nelle situazioni difficili
- La Dott.ssa *Nadia Papini* e la Dott.ssa *Cristina Tringali* per la loro disponibilità e per i loro numerosi suggerimenti
- Il Dott. *Giacomo Palazzolo*, la Dott.ssa *Erika Conforti*, la Dott.ssa *Raffaella Scaringi* e la Dott.ssa *Sonia Bergante* per l'amicizia, l'aiuto e la collaborazione che quotidianamente mi hanno donato
- La Dott.ssa *Federica Cirillo*, il Dott. *Domenico D'amario* e il Dott. *Donato Cappetta* per il loro sincero e prezioso supporto