



Università degli Studi di Pisa

Dipartimento di Biologia

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata alla Biomedicina,
Curriculum Neurobiologico**

Tesi di Laurea Magistrale

**Utilizzo di una tossina batterica, il fattore citotossico
necrotizzante 1 (CNF1) per il trattamento di glioma in
un modello di topo**

A.A. 2012/2013

Candidato
Enrico Pracucci

Relatore
Dott. Matteo Caleo

Correlatori
Prof.ssa Irma Nardi
Prof. Mario Pellegrino

INDICE

1	RIASSUNTO	1
2	INTRODUZIONE	3
2.1	Gliomi	3
2.2	Modelli animali di glioma	5
2.3	Terapia del glioma	10
2.4	Meccanismi di morte cellulare	11
2.5	CNF1	13
2.6	Bersagli di CNF1: le Rho-GTPasi	15
2.7	Effetti del CNF1 sulle cellule in proliferazione	17
2.8	Effetti del CNF1 sui neuroni	18
2.9	Utilizzo del CNF1 per il trattamento di patologie neurologiche in modelli animali	20
2.9.1	Malattia di Alzheimer	20
2.9.2	Sindrome di Rett	20
2.10	Razionale ed obiettivo della tesi	21
3	MATERIALI E METODI	23
3.1	CNF1	23
3.2	Colture cellulari di cellule di glioma GL261	23
3.3	Saggio di sopravvivenza cellulare	23
3.4	Saggio di apoptosi e necrosi	23
3.5	Test di senescenza cellulare	24
3.6	Induzione del glioma in topo	24
3.7	Iniezioni di CNF1	24
3.8	Impianto delle mini-pompe di temozolomide	24
3.9	Quantificazione del volume tumorale	25
3.10	Colorazione di Golgi-Cox	26
3.11	Registrazione di VEP cronici	27
3.12	Analisi elettrofisiologica acuta	27
4	RISULTATI	29
4.1	Multinucleazione delle cellule di glioma GL261 indotta da CNF1	29
4.2	Il CNF1 induce la degenerazione delle cellule di glioma GL261 entro 15 giorni dal trattamento	30
4.3	Meccanismi di morte cellulare indotti dal CNF1	31
4.4	Induzione di una massa tumorale nella corteccia visiva di topo	34
4.5	Il trattamento con CNF1 2 nM prolunga la sopravvivenza dei topi iniettati con cellule GL261	37
4.6	Effetti di un classico antitumorale: il temozolomide	38

4.7	Effetti del trattamento con CNF1 80 nM	40
4.8	Marcatura delle strutture neuronali con la colorazione di Golgi	42
4.9	Analisi elettrofisiologica acuta	43
4.10	Analisi elettrofisiologica cronica	45
5	DISCUSSIONE	47
5.1	Analisi <i>in vitro</i>	47
5.2	Analisi <i>in vivo</i>	48
6	BIBLIOGRAFIA	53

1 RIASSUNTO

I glioblastomi sono un tipo di tumore cerebrale poco responsivo a tutti i trattamenti attualmente disponibili. Per questo motivo c'è necessità di sviluppare nuove terapie per questa patologia.

Durante l'internato di tesi ho testato una tossina batterica per il trattamento di glioblastoma nel topo.

La tossina utilizzata è il fattore citotossico necrotizzante 1 (CNF1), un'esotossina prodotta da un ceppo patogeno di *Escherichia coli*. CNF1 è una proteina monomerica, costituita da una porzione N-terminale che si lega alle cellule, una regione intermedia che media la traslocazione attraverso la membrana e un dominio C-terminale che possiede attività catalitica. Nel citosol la parte C-terminale catalizza la deamidazione di un residuo di glutammina delle Rho-GTPasi (RhoA, Rac1 e Cdc42), impedendo così la loro attività GTPasica e lasciandole in uno stato di costante attivazione.¹

Questo comporta l'inibizione della citodieresi con conseguente multinucleazione nelle cellule che hanno capacità di dividersi. Inoltre è stato osservato un effetto di aumento della plasticità nei neuroni trattati, in assenza di fenomeni neurotossici.²

Sulla base di queste evidenze, si è deciso perciò di testare la tossina su un modello di glioma di topo, costituito dalla linea cellulare GL261. Questa è una linea di cellule derivate da topi del ceppo C57Bl/6 in cui si è provocato l'insorgere di un astrocitoma tramite trattamenti con l'agente cancerogeno 3-metilcolantrene. Una delle loro caratteristiche è di poter essere iniettate nella corteccia di topi singenici del ceppo C57Bl/6 e dare origine a tumore senza necessità di indurre immunosoppressione.

Dapprima il CNF1 è stato testato *in vitro* su colture di cellule GL261. Le cellule così trattate risultavano multinucleate, smettevano di proliferare e quindi andavano incontro a degenerazione.

Quindi si è voluto verificare il tipo di morte cellulare cui esse vanno incontro. Circa il 65% delle cellule trattate con la tossina esprimono marker di necrosi tardiva 10 giorni dopo il trattamento, mentre si è potuta escludere la morte per apoptosi. Rimane aperta la possibilità di una morte per senescenza, suggerita anche dalla morfologia delle cellule trattate, che appaiono appiattite e con nucleo e nucleoli di dimensioni maggiori.

Inoltre si è ottenuto un modello *in vivo* mediante l'iniezione intracorticale di cellule di glioma murino della linea GL261 in topi singenici nell'area visiva primaria. In questi topi, dopo 5 giorni dall'iniezione delle cellule, è stato poi iniettato il CNF1 in concentrazione 80 mM nella medesima area cerebrale.

Nell'internato di tesi ho seguito il test di sopravvivenza di topi con glioma trattati con CNF1. La loro sopravvivenza risulta significativamente maggiore rispetto ai topi con glioma trattati con una soluzione veicolo (che muoiono circa dopo 28 giorni) e anche rispetto a topi con glioma trattati con farmaci chemioterapici classici, come il temozolomide. In effetti circa metà dei topi trattati con CNF1 è sopravvissuta per almeno 60 giorni dopo il trapianto delle cellule.

Quindi ho partecipato all'analisi elettrofisiologica dell'attività corticale in un'area circostante l'iniezione delle cellule tumorali, per evidenziare differenze fra topi trattati con CNF1 e soluzione veicolo, dopo 21 giorni dall'iniezione delle cellule. L'analisi elettrofisiologica è stata eseguita tramite esperimenti acuti di inserimento di elettrodi extracellulari nella corteccia cerebrale, in cui si sono misurati i potenziali evocati da stimoli visivi (VEP). Le analisi quantitative di questi esperimenti sono tutt'ora in corso.

Nei topi registrati, ho poi misurato anche il volume totale del tumore. I dati preliminari, su 6 topi di controllo e 6 topi trattati con CNF1, indicano una riduzione nel volume del tumore in seguito al trattamento con CNF1.

Sto anche assistendo alla realizzazione di impianti cronici di elettrodi extracellulari nella corteccia visiva dei topi iniettati con le cellule GL261, al fine di seguire variazioni dei VEP nel corso dello sviluppo del tumore.

Ho lavorato anche su due sistemi per analizzare modifiche strutturali (come le spine dendritiche) nei neuroni circostanti il tumore: la colorazione di Golgi e l'utilizzo di topi con neuroni marcati con GFP.

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono un effetto positivo del CNF1 sulla sopravvivenza di topi affetti da glioma e una riduzione di volume della massa tumorale, che rende questa tossina un possibile candidato nella terapia per i tumori del sistema nervoso centrale.

2 INTRODUZIONE

2.1 Gliomi

I gliomi sono il tipo di tumore primario più comune nel sistema nervoso centrale dell'adulto, con 30000 nuovi casi diagnosticati ogni anno negli Stati Uniti d'America.³

I gliomi racchiudono diversi tipi di tumori primari con caratteristiche istologiche simili alla glia nel sistema nervoso centrale.

Questi gliomi derivano principalmente da astrociti (astrocitomi), oligodendrociti (oligodendrocitomi), cellule ependimali (ependimomi) o da un insieme di cellule gliali di tipo differente.⁴

La classificazione più utilizzata dei gliomi umani è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, WHO in lingua inglese).⁵ Il sistema dell'OMS divide i gliomi diffusi in tumori astrocitari, oligodendrogliomi e oligoastrocitomi. A questi sono quindi assegnati dei gradi a seconda del grado istologico di malignità.⁶

Gli oligodendrogliomi e oligoastrocitomi sono classificati come lesioni di grado II e lesioni di grado III anaplastiche.

Gli astrocitomi includono lesioni di grado II, grado III e grado IV, dove il grado IV è conosciuto come glioblastoma.

Il sistema dell'OMS è un sistema di classificazione pratico per analizzare i tumori, che, nella maggior parte dei casi riesce a inserire tumori in categorie specifiche.

Però gli schemi di classificazione che sono basati su soli criteri visivi sono, per definizione, soggettivi e permettono un certo grado di interpretazione a seconda dell'individuo.

Inoltre questi raggruppamenti tradizionali sono soddisfacenti solo in una serie di casi e non prevedono necessariamente il comportamento, la responsività a una terapia o la sopravvivenza di ogni caso di tumore nei pazienti.

Alcuni gliomi diffusi sono difficili da inserire in una di queste categorie, che può risultare in diagnosi vaghe del tipo "glioma maligno non meglio specificato".

In altri casi, si può osservare che la diagnosi istologica non coincide con il decorso clinico osservato. Per questo motivo si è cercato di caratterizzare questi tumori da un punto di vista molecolare.

Infatti, dalla scoperta che il cancro è una malattia genetica (somatica), che insorge quando compaiono dei difetti in geni che regolano la crescita cellulare, ha rivoluzionato la nostra comprensione della cancerogenesi.

Da quel momento, indagando le basi genetiche dei gliomi, si è ottenuta una grande quantità di informazioni sui specifici eventi genetici che stanno alle fondamenta della formazione e della progressione dei gliomi umani.⁷

Ci sono specifiche alterazioni molecolari associate con gliomi astrocitari e altri cambiamenti genetici che sono invece associati agli oligodendrogliomi.

Tuttavia, ci sono particolari cambiamenti genetici che si possono avere in alcuni astrocitomi e non in altri, oppure solo in alcuni oligodendrogliomi, suggerendo che ci possano essere sottotipi molecolari di tumori che sono definiti istologicamente astrocitomi o oligodendrogliomi.

Sapendo questo, è anche lecito ipotizzare che ogni sottotipo richieda un set unico e specifico di trattamenti.

Per quanto riguarda i glioblastomi, sono stati definiti dei subset genetici, ad esempio in base alla presenza di una di due alterazioni mutualmente esclusive: TP53 ed EGFR. Infatti l'amplificazione del gene EGFR non avviene quasi mai nei glioblastomi che hanno mutazioni di TP53 oppure perdono un allele del cromosoma 17p.^{8,9,10,11,12,13}

Il pathway dei gliomi che include l'inattivazione di TP53 è caratteristico (ma non esclusivo) dei glioblastomi che si sono formati in giovani adulti attraverso progressione tumorale a partire da astrocitomi di grado inferiore (il cosiddetto "glioblastoma secondario").^{10,14,15}

I glioblastomi con amplificazione del gene EGFR invece capitano più spesso in pazienti più anziani con una breve storia clinica e nessun caso definito di astrocitoma di basso grado. Questi sono detti glioblastomi primari.¹⁰

La correlazione delle alterazioni genetiche con l'età dei pazienti è ovviamente di grande interesse clinico.

L'identificazione delle mutazioni più comuni nei glioblastomi sono molto importanti, oltre che per lo sviluppo di nuove terapie, anche per la diagnosi e l'immediata identificazione del sottotipo di glioblastoma che si vuole trattare.

WHO II	astrocytoma (3-10 yrs; ? %)	oligo-astrocytoma (5-12 yrs; ? %)	oligodendroglioma (8-20 yrs; ? %)
WHO III	anaplastic astrocytoma (2-5 yrs; 10-30%)	anaplastic oligo-astrocytoma (2-8 yrs; 20-60%)	anaplastic oligodendroglioma (2-10 yrs; 40-80%)
WHO IV	glioblastoma (1-2 yrs; 10%)		

Figura 1 Grading dei gliomi diffusi secondo l'OMS. Fra parentesi è riportato il range di sopravvivenza. La percentuale indica la frequenza di risposta alla terapia, dato che è incerto nel caso dei gliomi di grado II.

La ricerca di nuove terapie è particolarmente importante per quanto riguarda il glioblastoma multiforme (GBM), che è un glioma di IV grado considerato uno dei sottotipi di tumore più maligni e invasivi (Figura 1), con una sopravvivenza mediana di 14,6 mesi, anche dopo radioterapia e chemioterapia.¹⁶

Il GBM è caratterizzato istologicamente da caratteristiche di atipia cellulare, grave necrosi e un elevato tasso di angiogenesi.

Non esiste attualmente cura per questa grave malattia e il trattamento multimodale del GBM consiste tipicamente di una resezione chirurgica seguita da chemioterapia e radioterapia concomitante.

2.2 Modelli animali di glioma

Durante gli anni sono stati elaborati diversi modelli animali per lo studio del glioma. Gli organismi più utilizzati sono il topo, il cane, Danio rerio e *Drosophila melanogaster*.

Il modelli murini hanno come vantaggi un ciclo vitale relativamente breve (vita media di circa 3 anni), la facile manipolazione dell'animale e la possibilità di ottenere topi transgenici con protocolli consolidati.

Nel corso degli anni, è stata prodotta una grande varietà di modelli murini di glioma.

I modelli utilizzati si possono distinguere principalmente in quattro categorie:

1. Trapianti di tumore in topi immunosoppressi
2. Trapianti di tumore in topi singenici immunocompetenti
3. Topi transgenici
4. Modelli retrovirali

I modelli ottenuti con trapianti di tumore in topi immunosoppressi sono modelli in cui si utilizzano i cosiddetti topi “nudi”, che presentano una mutazione genetica che fa sì che abbiano un timo deteriorato e assente e quindi hanno una risposta T-dipendente deficitaria. Questo li rende deficienti di risposta di rigetto da trapianti, rendendo possibile l’impianto di cellule tumorali di glioma umano nel loro encefalo.¹⁷

Questi modelli hanno spesso diverse caratteristiche in comune con i casi di glioma umano, ma anche delle differenze. Inoltre vengono a mancare quelle interazioni fra glioma e sistema immunitario dell’ospite che invece non dovrebbero essere trascurati nello studio dei tumori.

I modelli di glioma umano trapiantato in topi immunocompromessi più utilizzati sono il modello U251 e il modello U87.

Il modello U251 è stato ottenuto da un paziente maschio di 75 anni affetto da GBM.^{18,19}

Il modello intracranico U251 ricapitola la maggior parte delle caratteristiche chiave del GBM a livello istopatologico.^{20,21,22}

Con colorazione ematossilina/eosina, le cellule U251 mostrano un pattern di invasione infiltrativa nel parenchima cerebrale, con importanti foci di necrosi “a palizzata”, un tortuoso pattern di proliferazione microvascolare, endotelio ipertrofico, pleiomorfismo cellulare, cellule giganti multinucleate, atipia con figure mitotiche e nucleoli irregolari, foci di edema ed emorragie.

Anche se il pattern di invasione non è fortemente diffuso verso la materia bianca, il modello presenta satellitosi perivascolare e una diffusione a livello subpiale.

Però il modello manca di satellitosi e invasione lungo la materia bianca.

Le analisi immunoistochimiche mostrano forti somiglianze con i GBM umani: ci sono cellule neoplastiche positive alla GFAP (proteina fibrillare acida della glia), vimentina e S100B.

Il modello di glioma U87 è un modello che presenta differenze più significative con i casi di GBM umano e con il modello U251.

Ciononostante è stato un modello molto utilizzato per studiare l’angiogenesi tumorale e per testare terapie anti-angiogeniche.²⁰

Da un punto di vista istopatologico, questi tumori presentano atipia con figure mitotiche e nucleoli irregolari, e neovascolarizzazione profusa. Diversamente dai GBM, il modello U87 mostra un pattern di crescita infiltrativa non diffusiva, con una massa tumorale ben demarcata e cricondata da astrociti attivati.

La vascolatura tumorale mostra vasi più omogenei e aperti, che garantiscono un maggiore accesso a farmaci sistemici, a differenza del GBM.

I tumori U87 sono negativi ad analisi immunohistochemiche per la GFAP e S100, ma sono positivi alla vimentina e parzialmente (40%) a Ki-67.

Per superare questo problema si possono utilizzare modelli che effettuano il trapianto di cellule di glioma di topo in topi che appartengono allo stesso ceppo da cui sono derivate le cellule. Questo trapianto, detto singenico, non porta a rigetto anche se i topi sono immunocompetenti.

Questo è il tipo di modello che ho utilizzato nel corso della mia attività di tesi.

In particolare il tipo di modello che ho utilizzato prevede l'impianto delle cellule GL261 ed è il modello singenico più comune.

Le cellule della linea GL261 sono state ottenute nel 1939 da un tumore di topo ottenuto impiantando negli encefali di topo 20 pellet di metilcolantrene.²³

Queste cellule possono essere iniettate in topi del ceppo C57BL/6 senza bisogno di un sistema immunitario compromesso.

Descrizioni iniziali del tumore GL261, lo descrivevano come un tumore con le caratteristiche degli ependimoblastomi. Lavori recenti hanno approfondito le analisi rivelando che le cellule GL261 sono cellule scarsamente differenziate che mostrano morfologia simile alle cellule dei GBM umani.

Una delle peculiarità di questo modello sono le caratteristiche di infiltrazione diffusa e invasiva delle cellule GL261 nel tessuto sano.

Esami istopatologici hanno dimostrato che l'invasione di singole cellule tumorali si può avere anche a diversi millimetri di distanza dal margine del tumore.²⁴

Queste cellule invasive mostrano varie delle "strutture secondarie di Scherer":

- i. Satellitosi perineurale
- ii. Satellitosi perivascolare
- iii. Diffusione subpiale
- iv. Invasione lungo i tratti di materia bianca²⁵

Inoltre, cellule del tumore GL261 esprimono CXCR4 (recettore 4 delle chemochine CXC), che è stato associato alle proprietà invasive e migratorie delle cellule GL261.

Il tumore GL261 presenta anche ispessimento dell'endotelio, basato su un' aumentata espressione di CD31.

Come i GBM, anche i GL261 presentano aree di necrosi a pseudo-palizzate e presenta diversi marker comuni: le GL261 risultano positive a GFAP e S100, mentre le cellule endoteliali sono positive a CD31.

Inoltre il tumore GL261 contiene aree di angiogenesi e ipossia, che correlano con l'espressione di VEGF e HIF-1 α ; entrambi questi marcatori sono correlati a un aumento della crescita del tumore e una riduzione della sopravvivenza in pazienti con GBM.

Un diverso tipo di modello, che invece sfrutta le conoscenze sulla genetica dei tumori, è il modello transgenico, in cui si producono topi transgenici deficienti per dei geni chiave la cui alterazione è correlata all'insorgere di gliomi.

Il problema principale di questi modelli è dovuto al fatto che il glioma si sviluppa spontaneamente, quindi non è possibile scegliere il sito dove si forma il tumore e spesso si formano un insieme di diversi tumori con gradi diversi (astrocitomi di basso grado e glioblastomi di elevato grado). Inoltre la penetranza può essere piuttosto bassa: solitamente meno della metà dei topi sviluppano glioma. Questi fattori più un tempo di latenza più lungo rispetto agli altri modelli rendono questo modello più costoso e più difficile da gestire. Ciononostante è un modello che viene usato per comprendere la biologia tumorale che predispone all'insorgere del GBM.

Questo problema è stato parzialmente risolto con l'introduzione di modelli retrovirali di glioma, che si sono rivelati strumenti potenti per rispondere a domande sulle cellule da cui originano i gliomi, sulle lesioni genetiche necessarie per la formazione di tumori, sulle interazioni delle cellule tumorali con il microambiente dell'encefalo e per testare modalità terapeutiche sperimentali.

I modelli retrovirali di glioma usano i retrovirus per causare specifiche lesioni genetiche a popolazioni discrete di cellule in un determinato sito ad un determinato tempo.

A differenza dei modelli transgenici, nei modelli di glioma retrovirali le lesioni genetiche trasformanti sono introdotte direttamente nelle cellule somatiche e non alla linea germinale.

Inoltre, l'ingresso di un vettore retrovirale in una cellula dipende dalle interazioni fra le glicoproteine dell'involucro del virus e i recettori cellulari presenti sulle cellule dell'ospite.

Per esempio, il virus della leucosi aviaria (ALV) infetta soltanto le cellule che esprimono il recettore per il retrovirus aviario tv-a. Questo recettore non è normalmente presente sulle cellule dei mammiferi. Tuttavia, topi geneticamente modificati per esprimere tv-a possono essere infettati con virus ALV-RCAS (Replication Competent Avian Sarcoma Leukosis Virus with Splice acceptor).

Diversi modelli retrovirali di glioma usano il virus RCAS in topi transgenici che esprimono tv-a sotto il promotore della nestina o di GFAP.

Fra i diversi geni che potevano essere un potenziale bersaglio di queste tecniche, il PDGF è stato sempre preferito in letteratura, dato che il PDGF è implicato nella proliferazione e migrazione dei precursori della glia durante lo sviluppo, periodo in cui esprimono il recettore alfa per il PDGF,

ovvero PDGFR- α . Inoltre è stato scoperto che spesso nei gliomi sono espressi sia il PDGF che PDGFR- α , anche se a volte in gruppi di cellule tumorali differenti.

Questo dava inizio a segnalazione sia autocrina che paracrina nel glioma, che contribuisce alla spinta proliferativa del tumore. Nonostante l'espressione di PDGF si trovi frequentemente in tutti i gradi di glioma (a partire da astrocitomi a basso grado e oligodendrogliomi), i livelli più elevati di PDGF si trovano nei GBM suggerendo che la segnalazione del PDGF giochi un ruolo fondamentale sia in stati precoci di gliomagenesi che nella progressione tumorale.²⁶

È stata anche verificata una potente capacità di mitogeno del PDGF che stimola la proliferazione di cellule di glioma in maniera dose-dipendente.

Nei glioblastomi talvolta si trovano anche delle amplificazione del recettore PDGFR- α .

L'ipotesi di un ruolo importante del PDGF nella formazione di gliomi è stato dimostrato proprio attraverso i modelli di glioma retrovirali.

Utilizzando i vettori RCAS descritti esperimenti PDGF è stato possibile indurre la formazione di gliomi nel 40% dei topi dopo 12 settimane, usando topi GFAP/tv-a. Invece utilizzando topi nestina/tv-a, la penetranza è salita al 60%.²⁷

Inoltre i tumori ottenuti sono molto somiglianti ai casi umani di glioma da un punto di vista molecolare e istopatologico.

Il modello di glioma retrovirale è sicuramente molto interessante e offre grandi potenzialità, dato che il tumore viene indotto, invece di essere trapiantato.

Tuttavia un modello come il glioma GL261 rimane meno costoso e più semplice da utilizzare e offre la possibilità di allestire delle colture cellulari.

Per gli scopi della mia tesi, sembrava più conveniente orientarsi su un modello di glioma 261.

Model	Genetic lesions	Control of tumor initiation	Cell of origin	Pathology	Rate and frequency of tumor formation
Transplantation of glioma cell lines	Undefined	Can initiate tumor at specific place and time	Unknown	Does not resemble human gliomas	Rapid and consistent
Transplantation of primary glioma cells or cancer stem cells	Undefined	Can initiate tumor at specific place and time	Unknown	Recapitulates some aspects of human gliomas	Variable
Transgenic models	Well defined	Cannot control when and where tumor forms	Target cells on basis of specific promoters	Closely resembles human tumors	Variable
Retroviral models	Well defined	Can initiate tumor at specific place and time	Target specific cells at specific time and place	Closely resembles human tumors	Rapid and consistent

Figura 2 I tipi di modelli animali di glioma a confronto. I modelli retrovirali sono molto promettenti perché combinano vantaggi di più modelli diversi eliminandone parzialmente gli svantaggi.

2.3 Terapia del glioma

Come già accennato, nel caso di diagnosi di GBM, l'unica terapia disponibile è la resezione chirurgica accompagnata a chemioterapia e radioterapia.

Purtroppo, tramite resezione chirurgica si riesce a rimuovere soltanto la massa tumorale principale, mentre non sono eliminati foci microscopici di cellule tumorali che invadono il tessuto cerebrale circostante la massa tumorale principale. Questi foci sono poi responsabili di un'inevitabile recidiva. Anche le chemioterapie e radioterapie non riescono a ottenere la distruzione completa di questi tumori, dato che questa richiederebbe dosi troppo elevate di agenti chemioterapici o radioterapia, che comporterebbero anche un danno neurale cerebrale grave.

Per questo motivo c'è grande necessità dello sviluppo di nuove strategie per il trattamento del glioma.

Molti approcci stanno venendo investigati per il trattamento del glioma nei modelli animali, come la terapia genica citotossica sul tumore e la stimolazione immune. Inoltre le tecniche utilizzate si avvalgono di strumenti sempre più raffinati per il delivery delle sostanze alle cellule bersaglio.

Il trattamento chemioterapico standard per il trattamento del GBM sono agenti alchilanti come il temozolomide (TMZ), che viene somministrato oralmente o per via endovenosa.

Il TMZ è un profarmaco, che a pH fisiologico si converte spontaneamente nel metabolita attivo monometil-triazenoimidazolo-carbosammide (MTIC). MTIC è quindi successivamente idrolizzato alle specie attive metilanti: le metilidrazine. Il TMZ svolge la sua azione metilando la guanina in posizione N7 (70% degli addotti) e O6 (5% degli addotti) e adenina in posizione N3 (9%). Questi addotti creano danno al DNA che porta ad apoptosi e citotossicità.²⁸

Il TMZ ha una preferenza per la guanina centrale delle sequenze GGG, in cui produce O6-metilguanina (O6MeG), l'addotto chimico più potente. L'O6MeG si appaia preferibilmente con timina e porta a transizioni GC-AT, iniziando un ciclo di riparazione di errati appaiamenti del DNA che porta a rotture della doppia elica e, in ultima analisi, all'apoptosi.

Ovviamente un grosso problema per l'applicazione del temozolomide, come di gran parte dei farmaci chemioterapici classici, è l'elevata aspecificità, il fatto che vanno a colpire tutte le cellule in attiva divisione, con effetti potenzialmente devastanti, soprattutto per organi che richiedono un elevato turnover cellulare (come fegato, intestino, tessuto epiteliale).

A questo si aggiunge l'ulteriore ostacolo costituito dalla barriera ematoencefalica, che funziona da filtro nei confronti di molti farmaci, che non possono così raggiungere il sistema nervoso centrale.

Per questa serie di motivi, la necessità di nuove strategie per il trattamento dei gliomi è piuttosto impellente.

2.4 Meccanismi di morte cellulare

I destini a cui può andare incontro una cellula dopo un danno sono principalmente due: l'apoptosi e la necrosi.

L'apoptosi è detta anche morte programmata. A differenza della necrosi, questo tipo di morte può anche non essere patologica, può avvenire fisiologicamente, per esempio durante lo sviluppo per rimodellare alcuni organi o nel sistema immunitario per cessare una risposta immune. È un tipo di morte cellulare che può essere indotta da una grande varietà di fattori, come segnali esterni che attivano i cosiddetti recettori di morte oppure per segnali endogeni, come ad esempio lo stress ossidativo o la presenza di un danno genetico; l'induzione dell'apoptosi è caratterizzata da una

cascata del segnale, che coinvolge delle proteasi, le caspasi, che hanno il ruolo di amplificare il segnale (proteolizzandosi e quindi attivandosi) e sono anche veri e propri effettori (attivano per esempio le nucleasi che digeriscono il DNA e sono responsabili della disgregazione del nucleo).

Durante la morte per apoptosi, la cellula muore senza riversare però il suo contenuto all'esterno, bensì viene riconosciuta da macrofagi che la fagocitano rapidamente.

Questo è reso possibile dal fatto che la cellula apoptotica perde rapidamente la sua asimmetria di membrana. Ciò comporta che la fosfatidilserina, che normalmente è confinata nel foglietto interno della membrana plasmatica, sia trasferita sul foglietto esterno. Qui il fosfolipide può essere riconosciuto dai fagociti che provvedono a eliminare la cellula.

Molti farmaci chemioterapici classici agiscono proprio introducendo nelle cellule tumorali dei danni genetici tali che la cellula non ha scelta se non andare in apoptosi.

Putroppo ci sono anche tumori che sono particolarmente resistenti all'induzione dell'apoptosi e inoltre la stessa pressione selettiva che si applica somministrando un farmaco antitumorale può fare sì che tipi cellulari resistenti vengano selezionati nel tumore.

La necrosi invece è un fenomeno che ha sempre caratteristiche patologiche. È un tipo di morte che solitamente si verifica quando la cellula subisce un danno irreversibile piuttosto traumatico. La cellula necrotica perde la sua integrità di membrana e riversa il suo contenuto nello spazio extracellulare vicino. Parte delle sostanze che vengono riversate segnalano la presenza di un danno cellulare e inducono infiammazione dell'area circostante, a differenza dell'apoptosi che è una morte più "pulita".

Ci sono test per marcare le cellule apoptotiche e necrotiche che sfruttano i diversi meccanismi di questi tipi di morte.

La doppia marcatura con annexina e ioduro di propidio permette di discriminare parzialmente fra i due. L'annexina V (annexina A5), marcata con un fluoroforo, lega la fosfatidilserina sulla membrana cellulare che rimangono esposti verso lo spazio extracellulare. Come detto, l'esposizione di fosfatidilserina sul lato esterno della membrana plasmatica è un segnale che indica che la cellula sta andando incontro ad apoptosi.

Invece lo ioduro di propidio (PI) è un agente intercalante fluorescente che emette luce nel rosso. PI si può però legare ai nuclei solo se la cellula ha perso la sua integrità di membrana. Per questo PI è un indicatore di necrosi, dato che questo tipo di morte comporta una permeabilizzazione della membrana.

Ciononostante il PI non permette di discriminare una cellula necrotica da una cellula in fasi tardive di apoptosi, in cui pure si ha un aumento di permeabilità.

Un'altra caratteristica distintiva dell'apoptosi sfruttata per test molecolari è il taglio della proteina PARP (poli ADP-ribosio polimerasi) da parte delle caspasi. Questa proteina è coinvolta in meccanismi di riparazione del DNA, ma quando il danno è eccessivo viene inattivata. Alcuni test di apoptosi vanno proprio a verificare la presenza di proteine PARP tagliate, per confermare che la cellula è in apoptosi.

Un meccanismo connesso alla morte cellulare è l'autofagia (intesa come macroautofagia). L'autofagia è una funzione cellulare fisiologica che serve a mantenere l'omeostasi cellulare e consiste nella degradazione di porzioni di citoplasma e organuli della cellula.^{29,30}

L'autofagia ricopre un ruolo complesso e contraddittorio nelle cellule tumorali. Infatti l'autofagia in queste cellule può promuovere la sopravvivenza cellulare quando è in corso uno stress metabolico oppure può essere uno dei meccanismi scatenanti la morte cellulare.

Inoltre l'autofagia può indurre uno stato di senescenza cellulare nelle cellule tumorali, con effetto quindi anti-tumorale.

Alcuni marcatori per l'induzione dell'autofagia sono Atg12 e LC3-II, geni la cui espressione può essere rilevata in dei campioni tramite microarray.³¹

Anche la senescenza è uno dei destini a cui può essere avviata una cellula. La senescenza cellulare è un processo caratterizzato da una morfologia cellulare larga e appiattita, un arresto proliferativo irreversibile e un'espressione differenziale di geni, fra cui l'attivazione di modulatori negativi del ciclo cellulare. La senescenza è un processo che avviene naturalmente nelle cellule dopo un determinato numero di cicli replicativi (limite di Hayflick) a causa dell'accorciamento dei telomeri. La senescenza può essere anche indotta dall'attivazione di oncogeni (OIS, Oncogene-Induced Senescence). Questo meccanismo porta all'arresto proliferativo cellule che mostrano un'eccessiva attività replicativa ed è perciò un meccanismo antitumorale.

Esistono vari marcatori molecolari della senescenza cellulare; alcuni marcatori che caratterizzano la OIS sono p15^{INK4b}, DCR2 e DEC1.³²

2.5 CNF1

Il fattore citotossico necrotizzante 1 (CNF1) è una tossina isolata da un ceppo patogeno di *Escherichia coli*.^{33,34,35,36,37,38}

E. coli è una delle cause più importanti di infezioni intestinali. Questo batterio, che è normalmente parte della flora normale dell'intestino crasso, può diventare patogeno in seguito all'acquisizione di geni che codificano per fattori di virulenza.

Dal momento che questo batterio causa una grande varietà di infezioni extra-intestinali come setticemia, meningite neonatale e infezioni del tratto urinario (UTI), sono stati individuati diversi patotipi di *E. coli*.

Ceppi patogeni di *E. coli* coinvolti nelle UTI spesso esprimono anche esotossine come l'emolisina e il fattore citotossico necrotizzante 1 (CNF1) insieme a fattori di colonizzazione.

Il CNF1 è stato descritto per la prima volta a inizio anni '80 come una tossina capace di indurre una massiccia riorganizzazione dei microfilamenti cellulari di actina nelle cellule eucariotiche.

È stato in seguito dimostrato che il CNF1 attiva le proteine Rho di 21-kDa che legano GTP grazie a un'attività catalitica mai vista fino ad allora nelle tossine batteriche.

Negli *E. coli* uropatogeni, il CNF1 è codificato nel cromosoma da un singolo gene di 3042 paia di basi, da cui viene sintetizzata una proteina di 1014 residui amminoacidici, con massa molecolare di 108 kDa.

Alcuni ceppi enterotossici di *E. coli* isolati in animali, invece, producono CNF2, una tossina altamente omologa al CNF1 (identità di residui dell'86%).

Il gene *cnf1* è localizzato in un'isola di patogenicità (PAI).

Il CNF1, come già accennato, è sintetizzato come polipeptide a singola catena ed è organizzato in tre domini funzionali.

La regione N-terminale, costituita da 190 residui ammino-terminali, contiene un dominio di legame a recettori cellulari. Il CNF1 si lega saldamente ai suoi recettori con una costante di dissociazione molto bassa (2×10^{-11} M alle cellule Hep-2, una linea di cellule umane di laringe). Per quanto riguarda le cellule Hep-2, i recettori del CNF1 sono stati identificati come la proteina di 37 kDa precursore del recettore della laminina (LRP) e il recettore maturo della laminina (una proteina di 67 kDa derivata dalla dimerizzazione dei LRP), entrambe molecole che sono espresse ubiquitariamente.³⁹ Inoltre è stato dimostrato un ruolo importante degli eparansolfato proteoglicani (HSPG), delle molecole che fanno parte della matrice extracellulare, per l'ingresso del CNF1 nelle cellule.⁴⁰ È stato perciò ipotizzato che gli HSPG possano fungere da corecettori e che il CNF1 si leghi al complesso HSPG/LRP. L'ubiquitariet  del LRP e dell'HSPG⁴¹ possono spiegare come mai il CNF1 si leghi a una vasta popolazione di cellule differenti.⁴²

Il dominio di legame al recettore del CNF1 è seguito da un dominio centrale contenente due eliche idrofobiche. Sulla base dell'omologia di questa regione con la tossina difterica, si è ipotizzato che

questa porzione del CNF1 possa corrispondere al dominio di ancoraggio alla membrana, che permette l'inizio della traslocazione del dominio catalitico all'interno del citosol delle cellule bersaglio.

Infine, la regione C-terminale del CNF1 contiene il dominio enzimatico. Il dominio catalitico di deammidasi del CNF1 è stato cristallizzato e ne è stata determinata la struttura.

Il dominio di deammidasi forma una tasca stretta ($15 \times 30 \text{ \AA}^2$) e profonda (10 \AA) all'interno della quale è localizzata la triade catalitica, corrispondente ai residui V833, C866 e H881. Mutazioni sito-dirette a questi residui provocano l'abolizione dell'attività catalitica.

2.6 Bersagli di CNF1: le Rho-GTPasi

Il citoscheletro delle cellule eucariotiche ha un ruolo centrale nelle interazioni ospite-patogeno. È essenziale per esempio per le funzioni di barriera epiteliale ed endoteliale, che prevenono e limitano l'invasione e la disseminazione di patogeni nei tessuti.¹

Inoltre il citoscheletro ha un ruolo fondamentale in diversi processi che coinvolgono le cellule del sistema immunitario, fra cui la migrazione, la fagocitosi, la formazioni di sinapsi immuni e la segnalazione nelle cellule immuni.

Perciò il citoscheletro viene tenuto sotto uno stretto controllo, in cui le GTPasi della famiglia Rho hanno un ruolo centrale.

Le GTPasi della famiglia Rho sono degli interruttori molecolari coinvolti in moltissime vie di segnalazioni, di cui alcune sono richieste per delle risposte immunitarie efficaci: sviluppo, attivazione e funzione di linfociti B e T, migrazione polarizzata e fagocitosi nei leucociti, la percezione di gradienti chemiotattici, e la regolazione della degranulazione e attività di NADPH ossidasi dei fagociti.

Per ricoprire tutti questi ruoli, le GTPasi di circa 20 kDa della famiglia Rho, che includono RhoA, Cdc42 e le proteine Rac, sono finemente regolate.

La maggior parte delle GTPasi della famiglia RHO passano da uno stato attivo legato a GTP a uno stato inattivo legato a GDP e viceversa. La forma inattiva è attivata dallo scambio GDP-GTP, che è indotto da membri di una ampia schiera di proteine (se ne conoscono circa 80) chiamate fattori di scambio di nucleotidi guanosinici (GEF). Questa attivazione avviene a livello della membrana cellulare, a cui la GTPasi è ancorata tramite un gruppo isoprenile che viene aggiunto post-traduzionalmente all'estremità carbossi-terminale della proteina.

La forma attiva legata a GTP è terminata dall'idrolisi del GTP a GDP, facilitata da alcune proteine attivanti le GTPasi (GAP) che sono un gruppo di almeno 60 proteine.

C'è una terza famiglia di proteine regolatorie che comprende solamente tre membri: gli inibitori della dissociazione dei nucleotidi guanosinici (GDI), che mantengono le GTPasi della famiglia Rho nel citosol grazie a un'interazione con la coda isoprenilica delle GTPasi, prevenendo così la loro attivazione.

Nel loro stato attivo (legato a GTP) le proteine della famiglia Rho modulano l'attività di molti effettori cellulari (proteine chinasi, fosfolipasi e proteine adattatrici), che sono almeno parzialmente specifici per certe alcune della famiglia Rho.

Esistono diversi tipi di tossine batteriche che interferiscono con l'attività delle GTPasi della famiglia Rho.

Una famiglia sono i fattori citotossici necrotizzanti (CNF), che attivano permanentemente alcune GTPasi della famiglia Rho. I membri più noti di queste tossine sono il CNF1, CNF2 e CNF3 di *E. coli* e il CNFY di *Yersinia Pseudotuberculosis*.

I CNF attivano le proteine Rho, Rac e Cdc42 deammidando un residuo di glutammina (Gln63 o Gln61) a glutammato. Questo cambiamento di amminoacido blocca l'idrolisi del GTP e blocca la proteina della famiglia Rho nello stato attivo (Figura 3).

Sembra che il CNF1 riconosca solo una piccola parte della proteina della famiglia Rho, dato che anche un peptide composto soltanto dai 20 residui amminoacidici che coprono la regione switch II di RhoA può essere deammidato da CNF1.

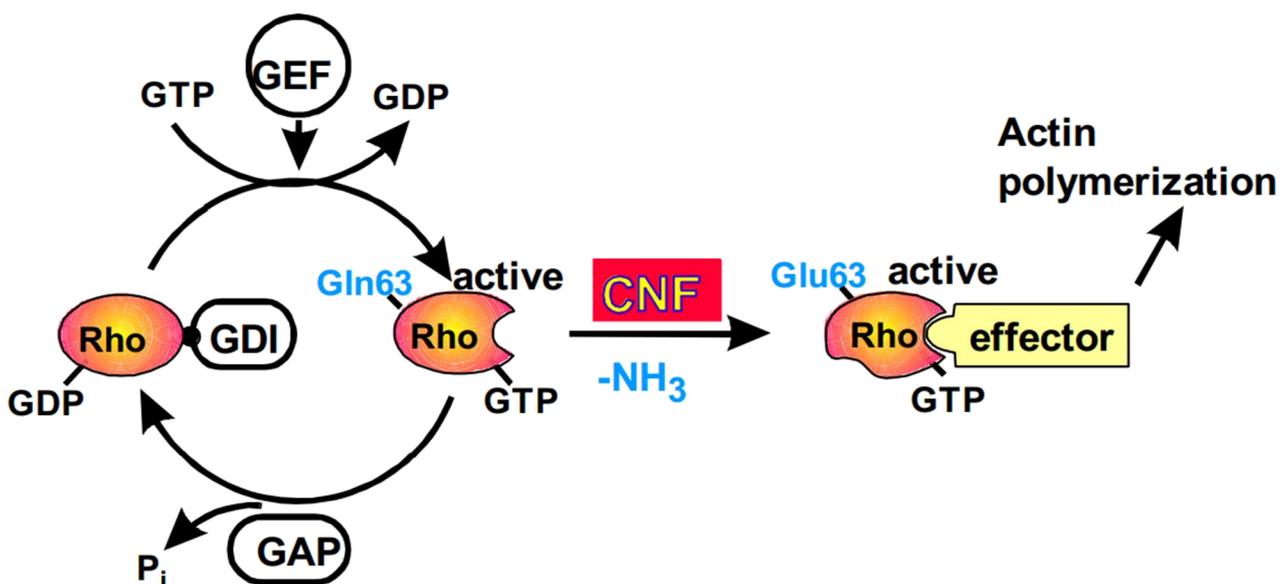


Figura 3 Meccanismo di azione del CNF1. La tossina modifica la Rho GTPasi sottraendola alla normale regolazione e lasciandola permanentemente attiva.³⁸

2.7 Effetti del CNF1 sulle cellule in proliferazione

L'attivazione delle proteine della famiglia Rho dovuta al CNF causa la formazione di fibre di stress, lamellipodi e filopodi. Questo è il risultato dell'attivazione di RhoA, proteine Rac e Cdc42 rispettivamente.

Inoltre, il CNF1 induce la formazione di cellule multinucleate (probabilmente per inibizione della citodieresi) e il disaccoppiamento della fase S dalla mitosi, e inibisce la catastrofe mitotica.

Nonostante tutti i CNF possano agire su una varietà di proteine della famiglia Rho in vitro, il loro effetto sulle cellule è diverso in vivo: mentre il CNF1 e CNF2 di *E. coli* attivano diverse GTPasi della famiglia Rho, il CNF3 di *E. coli* e il CNFY di *Y. pseudotuberculosis* sono altamente specifici per RhoA. Le ragioni di questa selettività sono al momento incerte.

L'attivazione persistente delle proteine della famiglia Rho in seguito alla deamidazione catalizzata dai vari CNF induce la successiva degradazione delle GTPasi per poliubiquitinilazione e taglio nel proteasoma.

La degradazione delle proteine della famiglia Rho può dare come risultato una diminuzione della risposta infiammatoria, che favorisce le infezioni batteriche.

Inoltre, a seconda delle differenti efficienze nell'attivare RhoA, le proteine Rac o Cdc42, nell'ubiquitinilazione e nella degradazione possono portare a variazioni nel fenotipo di actina indotto dai vari CNF.

Si sa poco invece degli effetti dell'attivazione permanente delle proteine della famiglia Rho sull'apoptosi. Esperimenti svolti su cellule epiteliali indicano un effetto protettivo del CNF1 dall'apoptosi indotta dal distacco delle cellule epiteliali dal substrato. Inoltre il CNF1 previene l'apoptosi indotta da raggi UV in colture di cellule epiteliali umane Hep-2 attraverso l'attivazione del pathway di Rac e Akt.

Però è stato mostrato anche che il trattamento con CNF1 di cellule di vescica 5637 stimola una risposta apoptotica.

Recentemente è stato messo a confronto l'effetto del CNF1 e CNFY su cellule in proliferazione in vitro⁴³. Il tipo cellulare testato sono le cellule LNCaP, una linea di cellule di adenocarcinoma prostatico umano. Le cellule rispondono sia a CNF1 che a CNFY. In entrambi i casi si è potuto osservare una deamidazione di RhoA (si può visualizzare come una minore mobilità elettroforetica di RhoA deamidata). Da esperimenti di pull-down (in cui si fa precipitare solo Rho

in forma attiva, grazie al suo legame specifico con dei domini proteici legati a sfere di sefarosio) si è ottenuta una precisa quantificazione della quantità di Rho attivata nei due casi ed è emerso che in realtà solo il CNFY induce un'attivazione permanente di RhoA nelle cellule LNCaP, mentre l'attivazione dovuta al CNF1 è transiente e svanisce in poche ore.

Inoltre si è dimostrato che il CNFY induce apoptosi nelle cellule LNCaP e che invece non ha effetto pro apoptotico in una serie di altri tipi cellulari: HeLa (cancro umano della cervice uterina), MCF10A (cancro umano della mammella), Caco2 (adenocarcinoma umano del colon-retto), HEK293 (cellule di rene umano embrionale trasformate) o C42 (sempre cellule di cancro umano alla prostata, ma indipendenti da androgeni).

Il quadro di azione del CNF si fa dunque molto complesso. Non solo ci possono essere notevoli differenze fra i vari sottotipi di CNF, ma l'effetto sulle cellule trattate può cambiare molto anche a seconda del tipo cellulare.

2.8 Effetti del CNF1 sui neuroni

Sono stati dimostrati anche effetti di tipo non tossico del CNF1 su neuroni: in questo caso la tossina ha un effetto di induzione di fenotipo plastico.

Infatti esperimenti in cui il CNF1 veniva iniettato intracerebroventricolarmente in topi hanno mostrato che i topi trattati con CNF1 hanno performance migliore in water maze.⁴⁴ In questo apparato sperimentale i topi dovevano apprendere la posizione di una piattaforma nascosta nell'acqua e dipende dal funzionamento dell'ippocampo (che si affaccia sui ventricoli cerebrali, cioè dove è stata fatta l'iniezione di CNF1). L'apprendimento è stato significativamente più rapido nei topi trattati con CNF1. Inoltre è stata effettuata anche una prova di reversal learning: i topi sono stati posti in un water maze dove la piattaforma è stata spostata rispetto al punto dove l'avevano sempre trovata; misurando il tempo che i topi impiegavano a trovare la nuova posizione e impararla, i topi trattati con CNF1 sono risultati ancora una volta migliori dei topi di controllo.

In seguito il gruppo ha effettuato delle analisi per controllare l'attività delle Rho GTPasi e hanno visto che, mentre dopo 4 ore dall'iniezione del CNF1 sia Rho che Rac sono attivate, dopo 10 giorni i livelli di Rho sono tornati normali, mentre Rac continua a mostrare un'attivazione maggiore dei topi di controllo.

Per questo motivo, gli effetti di tipo plasticizzante sono stati imputati all'attivazione di Rac che è di tipo long-lasting, dato che è stata trovata Rac attivata da CNF1 anche in cervelli di topi dopo 30 giorni dal trattamento.⁴⁴ Inoltre recenti studi hanno potuto confermare che il CNF1 porta a cambiamenti del fenotipo comportamentale in topi anche fino a 90 giorni dall'iniezione

intracerebroventricolare del CNF1; ⁴⁵ in questi casi non si è determinato se l'effetto comportamentale dato dal CNF1 dopo 90 giorni sia ancora dovuto all'attivazione prolungata di Rac oppure se sia causata dall'attivazione di elementi che stanno a valle rispetto alla cascata del segnale trasdotto da Rac.

Altri esperimenti effettuati nel ratto, hanno mostrato che se si inietta CNF1 nella corteccia visiva, i neuroni presenti subiscono dei cambiamenti morfologici: si ha un aumento significativo della densità e lunghezza delle spine nei neuroni corticali piramidali (Figura 4); ² effetti che sono stati confermati anche da analisi longitudinali effettuate tramite microscopio a due fotoni. ⁴⁶ Questi sono cambiamenti di tipo plastico, ma presentano anche delle differenze dal fenotipo plastico classico. Infatti, nonostante aumenti l'espressione di marcatori eccitatori presinaptici vGlut-2e vGlut-1, i cosiddetti "freni" della plasticità rimangono inalterati. I "freni" sono costituiti da elementi strutturali come i perineuronal net (elementi della matrice extracellulare che stabilizzano le sinapsi nel sistema nervoso centrale dell'adulto) e la mielina; questi due elementi rimangono inalterati, quindi il fenomeno che induce il CNF1 deve essere considerato a sé stante, anche se parzialmente sovrapponibile a fenomeni di plasticità corticale.

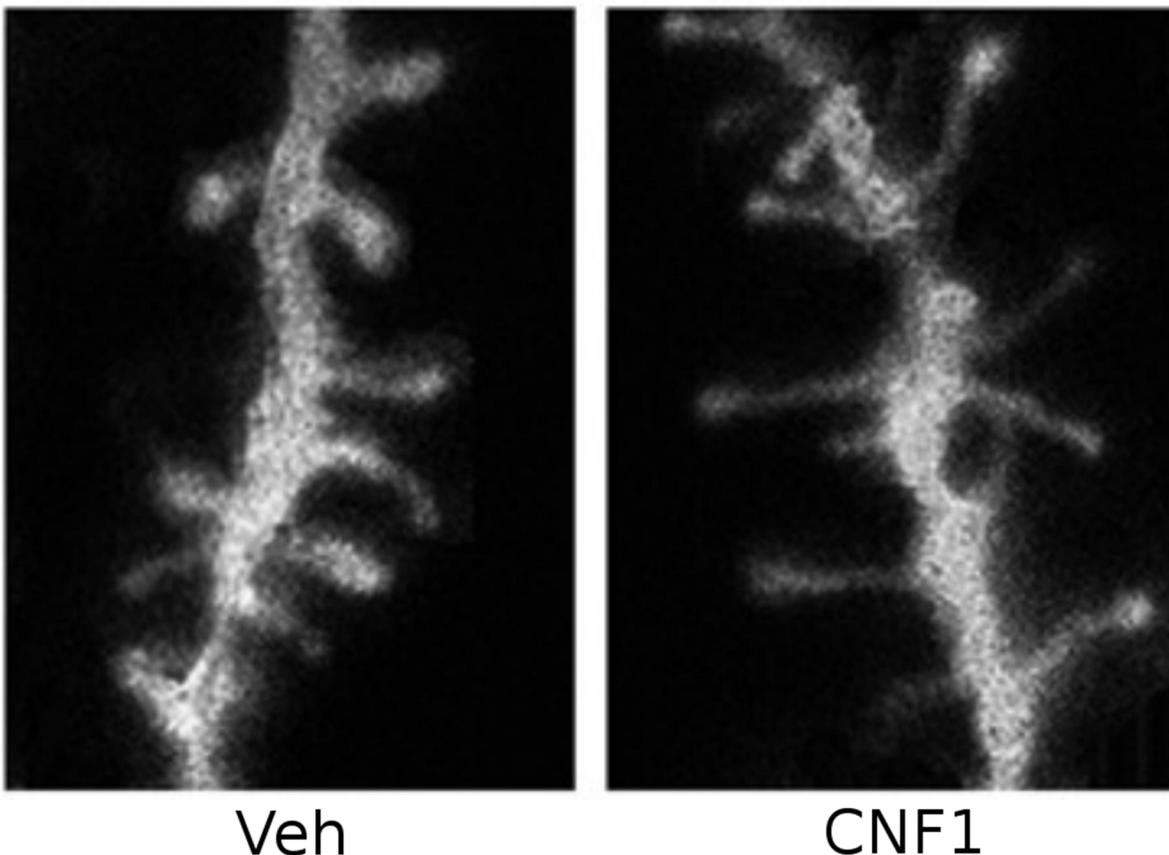


Figura 4 Il CNF aumenta la densità e la lunghezza delle spine (destra) rispetto a topi di controllo (sinistra)

2.9 Utilizzo del CNF1 per il trattamento di patologie neurologiche in modelli animali

2.9.1 Malattia di Alzheimer

Le proprietà plasticizzanti del CNF1 sono state sfruttate nel trattamento di topi TgCRND8.⁴⁷ Questi topi transgenici portano una forma doppiamente mutante della proteina precursore dell'amiloide (APP) e sono utilizzati come modelli della malattia di Alzheimer, che è caratterizzata da difetti del processamento di APP e da grave impairment della memoria e neurodegenerazione. Questi topi mostrano difetti di apprendimento in set sperimentali come i water maze.⁴⁸

La modulazione delle Rho GTPasi tramite CNF1 in questi topi ha avuto un effetto selettivo sulla memoria di lavoro/memoria a breve termine. Invece la memoria a lungo termine non è stata influenzata dall'applicazione di CNF1. Infatti si può osservare che il CNF1 migliora le prestazioni dei topi all'interno delle sessioni di test, ma non porta ad un apprendimento della posizione della piattaforma fra i diversi giorni.

Inoltre il trattamento con CNF1 ha portato anche a variazioni del fenotipo comportamentale. Infatti i topi TgCRND8 mostrano un aumento dell'attività locomotoria in test open field, in cui si misura l'attività locomotoria di topi posti in un'arena circolare. Il CNF1 diminuisce l'attività locomotoria di questi topi.

Anche il test del rotarod, in cui vengono testati equilibrio, coordinazione e pianificazione motoria dei topi che devono rimanere in equilibrio su un cilindro messo in rotazione, ha mostrato la capacità del CNF1 di correggere le alterazioni insorte nei topi TgCRND8.

Questi studi sono promettenti, anche perché è noto dalla letteratura che la segnalazione delle Rho GTPasi è coinvolta nelle vie di processamento di APP. Per esempio, l'attivazione di Rac1 è implicata nella produzione di sAPP α , che stimola la memoria e la connettività;⁴⁹ invece l'attivazione di RhoA porta a un aumento della produzione di A β ₄₂ che ha effetto neurotossico.⁵⁰ Si può presupporre un effetto positivo a lungo termine del CNF1, sapendo che porta un'attivazione soltanto transiente di RhoA e a un'attivazione di lunga durata di Rac1.⁴⁴

2.9.2 Sindrome di Rett

La sindrome di Rett è una rara malattia genetica che è causata da gravi difetti nello sviluppo del sistema nervoso e porta a ritardo mentale. Il 90% circa degli individui affetti da questa malattia sono causati da una mutazione nel gene della proteina legante metil-CpG 2 (MeCP2). MeCP2 ha diversi ruoli nella cellula e agisce principalmente come regolatore della trascrizione.⁵¹

Fa i geni target di MeCP2 sono stati descritti geni che influenzano l'attività delle Rho GTPasi e una delle alterazioni che si possono ritrovare in topi knock-out per MeCP2 sono riduzione nell'arborizzazione dendritica e della formazione delle spine (che sono legati all'attività delle Rho GTPasi).⁵² Da un punto di vista comportamentale, questi topi con MeCP2 non funzionante mostrano svariate alterazioni.⁵³ Ad esempio, mostrano scarso fear-conditioning, cioè mancano della capacità di imparare ad associare uno stimolo nocivo a uno stimolo non nocivo.

Il CNF1 in questi topi che mancano di un MeCP2 funzionante ripristina la risposta normale di condizionamento nei test di fear conditioning. Inoltre, mentre questi topi prima del trattamento mostrano un'alterazione nell'attività di costruzione del nido (indice di deficit delle capacità motorie), in seguito a trattamento con CNF1 mostrano una maggiore performance nella costruzione del nido.⁵⁴

2.10 Razionale ed obiettivo della tesi

Considerando l'insieme di queste caratteristiche del CNF1, ho pensato di sfruttare la tossina per il trattamento di un modello di glioma, con la speranza di potere candidare il CNF1 come possibile nuova terapia per il glioblastoma multiforme umano.

Prima di poter pensare al CNF1 come farmaco per il glioma umano, però, ho dovuto indagare passo per passo l'effetto del CNF1 sulle cellule di glioma.

Quindi, ho condotto i primi esperimenti su cellule in coltura, per testare l'efficacia di questa tossina nell'arrestare la proliferazione delle cellule tumorali.

Solo in seguito, dimostrata l'efficacia del CNF1 contro colture di glioma, si può provare a portare la tossina in un modello *in vivo*, ottenuto iniettando le cellule di glioma GL261 nella corteccia visiva primaria (così da potere eventualmente analizzare la funzionalità della corteccia con registrazioni elettrofisiologiche).

Anche in questo caso ho pianificato di procedere per gradi: prima di tutto testare se la tossina ha un effetto positivo sulla sopravvivenza di topi affetti da glioma e se questo effetto è paragonabile o addirittura superiore a quello di un farmaco chemioterapico classico come il temozolomide.

Se il CNF1 si dimostra competitivo da questo punto di vista, allora potrò andare a valutare lo stato della corteccia che circonda il tumore in topi trattati con CNF1 e topi di controllo, nella speranza che il CNF1 possa avere un ruolo protettivo nei confronti della corteccia visiva. Lo stato della corteccia peritumorale si può verificare sia da un punto di vista funzionale, tramite la registrazione elettrofisiologica di potenziali evocati da stimolo visivo ad esempio, oppure tramite la valutazione

della morfologia delle cellule, ad esempio posso misurare la densità e la lunghezza delle spine dendritiche.

3 MATERIALI E METODI

3.1 CNF1

Il CNF1 è stato ottenuto dal ceppo di E. coli 392 ISS (gentilmente provveduto da, V Falbo, Istituto Superiore di Sanità, Roma).

Il CNF1 è stato poi diluito a una concentrazione finale di 2, 18 e 80 mM con tampone Tris-HCl 20 mM a pH 7,5.

Ogni batch di CNF1 usato è stato testato su colture di cellule GL261; la sua attività è stata valutata contando il numero di cellule multinucleate dopo 48 ore dall'esposizione alla tossina.

3.2 Colture cellulari di cellule di glioma GL261

La linea cellulare di glioma murino GL261 è stata una gentile donazione del Dott. C. Sala (Istituto di Neuroscienze del CNR di Milano). Le cellule GL261 usate sono state coltivate in terreno completo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenente il 10% di siero di neonato bovino, 4,5 g/l di glucosio, glutammina 2 mM, 100 UI/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina, a 37°C e al 5% di CO₂ con sostituzione del mezzo tre volte alla settimana.

3.3 Saggio di sopravvivenza cellulare

Le cellule GL261 sono state raccolte tramite tripsinizzazione, contate e seminate su piastre da 24 pozzetti a densità nota. Per determinare l'effetto del CNF1 sulla proliferazione cellulare, le cellule GL261 sono state incubate con CNF1 18 nM. Nove o quindici giorni dopo il trattamento, le cellule sono state colorate con cristal violetto e contate al microscopio ottico.

3.4 Saggio di apoptosi e necrosi

Le cellule apoptotiche e/o necrotiche sono state determinate utilizzando il kit di colorazione AnnexinV-PI (PI: ioduro di propidio). Il saggio è stato effettuato seguendo le istruzioni del kit (Annexin V kit, BD Pharmingen). 300 cellule sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti e incubate in CNF1 18 nM per 10 giorni. Annexin V e ioduro di propidio sono stati diluiti 1:200 in mezzo BREB (NaCl 120 mM, NaKCO₃ 25 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, MgSO₄ 1,18 mM, CaCl₂ 2,5 mM, EDTA 0,026 mM, glucosio 5,5 mM). Le cellule sono anche state colorate con Hoechst (bisbenzimidide, Sigma; 1:500 in PBS) e contate tramite microscopia a fluorescenza.

3.5 Test di senescenza cellulare

Le cellule GL261 sono state trattate con tripsina, prelevate dalla piastra di coltura, contate e quindi seminate su piastre da 24 pozzetti con densità nota. Qui, dopo avere aspettato che le cellule aderissero al substrato, le cellule sono state trattate con CNF1 18 nM o con tampone (pozzetti di controllo).

Quindi, dopo 6 giorni dal trattamento, sono state sottoposte a rivelazione della presenza dell'enzima β -galattosidasi mediante la somministrazione di una molecola incolore che viene scissa dalla β -galattosidasi per dare origine a un cromoforo, che colora di blu le cellule in cui è presente.

3.6 Induzione del glioma in topo

Per indurre la formazione del glioma, topi C57BL/6 (12-14 settimane di età) hanno subito un'iniezione guidata da stereotassi di 40000 cellule GL261 (20000 cellule/ μ l in PBS) nella corteccia visiva (2 mm lateralmente alla linea mediana e in corrispondenza di lambda) usando micropipette fini di vetro (diametro della punta di 40 μ m). Tutte le procedure sperimentali sono state svolte in conformità con la direttiva 86/609/EEC e sono state approvate dal Ministro della Salute italiano.

3.7 Iniezioni di CNF1

Cinque giorni dopo l'iniezione delle cellule GL261 (induzione del tumore), i topi sono stati divisi in tre gruppi. Il primo gruppo ha ricevuto un'iniezione di CNF1, il secondo un'iniezione di tampone Tris-HCl (condizione di controllo).

Infusioni stereotassiche di CNF1/Tris-HCl (1 μ l di soluzione 18 o 80 nM) sono state effettuate nella corteccia visiva primaria di topi adulti sotto anestesia di avertina (iniezione intraperitoneale di una soluzione di 2,2,2-tribromoetano; 0,1 ml/5g di peso del topo). Le iniezioni di CNF1 sono state eseguite in tre siti: 1,5, 2 e 2,5 mm lateralmente rispetto alla linea mediana (per quanto riguarda la posizione sull'asse mediolaterale) e in corrispondenza di lambda (per quanto riguarda l'asse anteroposteriore). Iniezioni di CNF1/controllo sono state lentamente effettuate a profondità di 0,7-0,8 mm dalla superficie piaie.

3.8 Impianto delle mini-pompe di temozolomide

Pompe micro-osmotiche (Alzet 1007D; Alza, USA; velocità di infusione 0,5 μ l/h) sono state riempite con TMZ (in soluzione 20, 140 e 200 μ M) e collegate con tubi di polietilene a cannule da 30 G di acciaio inossidabile.

I topi sono stati anestetizzati con avertina e quindi sul loro cranio è stato praticato un foro di piccole dimensioni (posizionato a 2 mm lateralmente rispetto a lambda e 1 mm anteriormente). La cannula della mini-pompa è stata quindi inserita all'interno della corteccia attraverso il foro.

La mini-pompa veniva quindi posizionata a livello sottocutaneo, sotto il collo, e la cannula era assicurata al cranio con del cemento acrilico.

Giornalmente veniva controllata la sopravvivenza degli animali, che sono stati monitorati fino a settanta giorni dall'impianto del tumore.

3.9 Quantificazione del volume tumorale

Nei topi sono state iniettate cellule di glioma GL261 nell'area visiva primaria e, dopo 6 giorni, hanno ricevuto iniezione di CNF1 nella medesima area, nella maniera descritta precedentemente.

Gli animali sono stati poi prelevati a circa 21 giorni dopo l'iniezione delle cellule e sono stati profondamente anestetizzati con idrato di cloralio (2,2,2-tricloro-1,1-etandiolo); quindi, dopo una breve perfusione con soluzione salina (PBS) sono stati perfusi con una di paraformaldeide 4% disciolto in tampone fosfato. È stato prelevato l'encefalo, lasciato una giornata in post-fissazione in paraformaldeide 4% e quindi disidratato in saccarosio al 30% in soluzione acquosa di tampone fosfato per qualche giorno.

Sono state tagliate sezioni coronali dell'encefalo di spessore 30 µm tramite taglio a -80°C con un microtomo. Le sezioni sono state quindi trattate con il colorante Heochst.

La quantificazione del volume tumorale per ogni topo è stata effettuata tramite microscopio a fluorescenza, dopo la colorazione con il marcatore Hoechst.

Con un ingrandimento a 12,5x o 50x, si è misurata l'area di sezione di encefalo occupata da cellule tumorali, visibile per l'elevata popolosità cellulare. La misura è stata eseguita tramite il software NeuroLucida Microbrightfield su una sezione ogni sei.

Quindi, lo spessore di ogni sezione è 30 µm e il fattore di spaziatura fra le sezioni analizzate è 6.

L'area tumorale totale è la somma delle aree di ogni sezione misurata per un dato encefalo analizzato. A questo punto il volume totale è stato calcolato come l'area totale moltiplicata per lo spessore di ogni sezione e per il fattore di spaziatura:

$$Volume\ totale = Area\ totale \cdot 6 \cdot 30\ \mu m$$

Per ricostruire l'andamento anteroposteriore e fissare dei punti di riferimento anatomici, è stato utilizzato l'atlante neuroanatomico del cervello di topo.⁵⁵

3.10 Colorazione di Golgi-Cox

La soluzione di Golgi-Cox, utilizzata per la colorazione di Golgi, si ottiene a partire da tre diverse soluzioni:

- A. Dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) 5% in acqua deionizzata
- B. Cloruro di mercurio ($HgCl_2$) 5% in acqua deionizzata
- C. Cromato di potassio (K_2CrO_4) 5% in acqua deionizzata

Quindi bisogna mescolare 5 volumi di soluzione A con 5 volumi di soluzione B, ottenendo la soluzione A+B. 4 volumi di soluzione C devono essere diluiti in 10 volumi di acqua deionizzata. La soluzione C deve essere quindi mescolata gentilmente e vi deve essere aggiunta la soluzione A+B lentamente.

La soluzione che si ottiene in tal modo è la soluzione di Golgi-Cox, che, prima di poter essere utilizzata, deve essere agitata per 30 minuti, lasciata a riposo in una bottiglia di vetro al buio per cinque giorni e quindi deve essere nuovamente filtrata in un'altra bottiglia, senza prelevare il precipitato.

I topi sono stati profondamente anestetizzati con idrato di cloralio (2,2,2-tricloro-1,1-etandiololo) e sono stati perfusi con soluzione salina (PBS). Quindi è stato recuperato l'encefalo ed è stato posto in soluzione di Golgi-Cox al buio a temperatura ambiente per circa 6 giorni.

Trascorso questo tempo, l'encefalo dev'essere disidratato in saccarosio 30% per almeno due giorni, sempre mantenendolo al buio.

Una volta disidratato, l'encefalo viene tagliato al vibratomo, immerso in soluzione di saccarosio al 6%, in sezioni di spessore di 100-200 μm .

Quindi ho effettuato la rivelazione della colorazione di Golgi-Cox al buio, spostando i vetrini di soluzione in soluzione.

Prima di tutto ho effettuato due lavaggi dei vetrini per immersione in acqua deionizzata della durata di 5 minuti ciascuno. Quindi ho immerso i vetrini in idrossido di ammonio per 30 minuti. Trascorso questo tempo, ho effettuato altri due lavaggi di 5 minuti l'uno in acqua deionizzata dopodiché ho immerso i vetrini per altri 30 minuti in soluzione Kodfix (una miscela acquosa di tiosolfato di ammonio, bisolfito di sodio, solfito di ammonio, acido acetico, acido borico e solfato di alluminio. Seguono altri due lavaggi in di 5 minuti in acqua deionizzata.

In seguito i tessuti vengono disidratati con immersioni di 1 minuto in soluzioni acquose di etanolo: 1 minuto in etanolo 50% (V/V), poi in etanolo 70% e infine in etanolo 95%. Per completare la disidratazione, ho effettuato due immersioni in etanolo 100% della durata di 5 minuti ciascuna.

Quindi ho immerso i vetrini per 15 minuti in una soluzione composta per un terzo del volume da cloroformio, un terzo da xilene e un terzo da etanolo 100%.

Infine, i vetrini vengono immersi in xilene per 15 minuti.

A questo punto ho coperto i vetrini portaoggetto con una montante "Permout" (composto da una resina sintetica – polimero di α -pinene, β -pinene, dipentene e β -felandrene – disciolta in toluene) e con un vetrino coprioggetto.

Dopo questa procedura, le sezioni colorate sul vetrino possono essere analizzate con microscopio ottico a trasmissione.

3.11 Registrazione di VEP cronici

I topi sono anestetizzati con avertina. Quindi sono stati posti in un apparato stereotassico.

Qui è stato praticato un foro nel cranio a livello dell'area visiva primaria, a una distanza di 2,5 mm lateralmente a lambda ed è stato fatto scendere un elettrodo a 500 μ m dalla superficie della corteccia, nello strato IV, e un elettrodo sulla superficie.

Quindi è stata posizionata una vite di terra nell'osso occipitale.

A questo punto, collegando dei connettori agli elettrodi e alla vite si è creato un impianto, che poi è stato cementificato al cranio con cemento acrilico.

Questo impianto permette di registrare l'attività corticale quotidianamente, collegando una testina ai connettori e utilizzando un sistema di acquisizione digitale.

3.12 Analisi elettrofisiologica acuta

I topi sono stati anestetizzati con uretano e posti in apparato stereotassico. Una porzione del cranio soprastante l'area visiva primaria dell'emisfero sinistro è stata sollevata e rimossa. Abbiamo quindi registrato potenziali visivi evocati (VEP) in una matrice di 3x3 punti in un'area vicina al sito d'iniezione delle cellule tumorali. Le coordinate dei punti misurati, sull'asse anteroposteriore sono - 0,5, 0 e 0,5 mm rispetto a lambda, sull'asse mediolaterale sono 2,7, 3,0 e 3,3 mm rispetto a lambda. Tutte le misure sono state effettuate coprendo l'occhio ipsilaterale (sinistro), in modo da registrare solo risposte a stimoli monoculari.

In questi 9 punti si è effettuata una rapida misura del rapporto segnale/rumore della corteccia, ottenuto dividendo la risposta della corteccia a uno stimolo visivo forte (reticolo ad alto contrasto) per la risposta misurata in corteccia a uno stimolo neutro (reticolo a contrasto nullo).

Poi si è proceduto ad analizzare il punto più vicino al sito di iniezione che desse ancora una risposta rilevabile. In questo punto si sono registrati i VEP di risposta a reticoli con diversa frequenza spaziale ed elevato contrasto per valutare la soglia di contrasto delle cellule corticali. Inoltre si sono registrate le risposte a reticoli con frequenza spaziale fissa (quella che determina risposta massima) e contrasto variabile, per valutare la soglia di contrasto delle cellule. Variando invece la frequenza temporale dello stimolo si è misurata la risoluzione temporale delle cellule corticali.

Infine si è effettuata una registrazione di singole unità.

4 RISULTATI

4.1 Multinucleazione delle cellule di glioma GL261 indotta da CNF1

Le cellule GL261 sono state piastrate, fatte attaccare e trattate con CNF1 2 nM o soluzione di controllo (tampone TRIS) per ventiquattro ore.

Trascorso questo tempo, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4%, sono state colorate e quindi analizzate al microscopio.

Dopo sole ventiquattro ore dal trattamento si ha già un effetto evidente di multinucleazione indotta dal CNF1 (Figura 5).

Il CNF1 infatti entra nelle cellule di glioma e attivando permanentemente le Rho GTPasi, provoca l'alterazione del citoscheletro di actina. L'actina è importante per varie funzioni cellulari, ma in queste cellule costantemente in divisione, ha un ruolo particolarmente importante perché avvenga la citodieresi. Le GL261 trattate con CNF1 non sono in grado di portare a termine la divisione cellulare e dividono i loro nuclei senza però dividere il citoplasma, dando origine alle cellule multinucleate che sono state osservate.

Questa stessa procedura è poi stata utilizzata per testare ogni nuovo batch di CNF1 che veniva scongelato, prima di poterlo utilizzare per esperimenti *in vivo*.

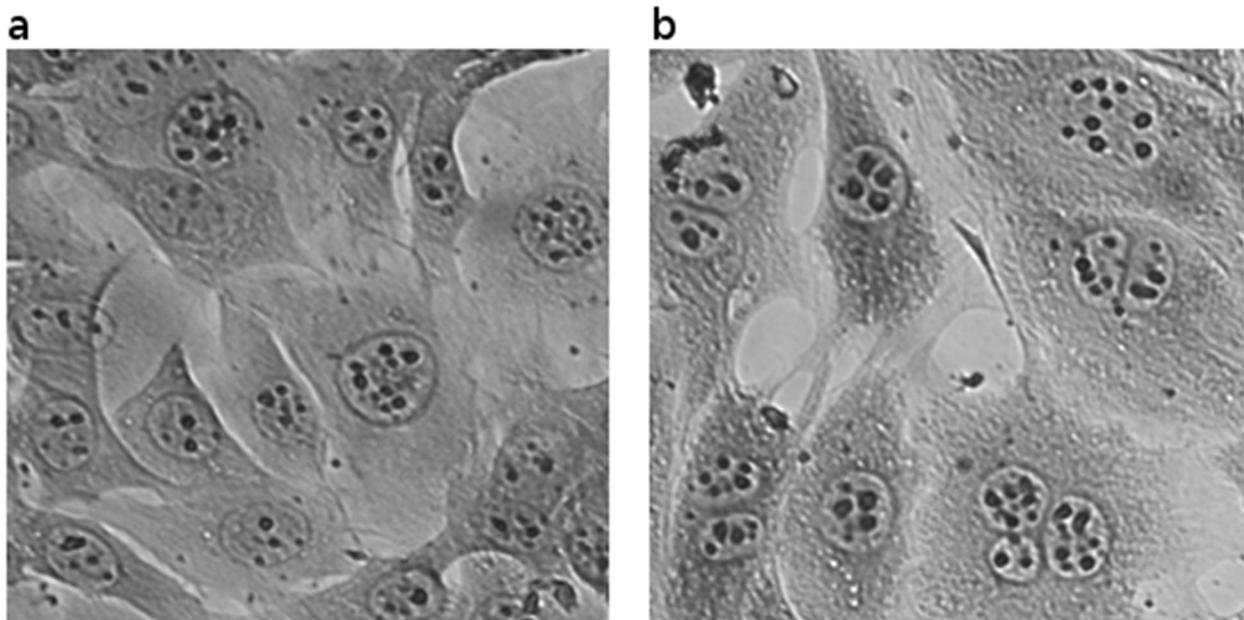


Figura 5 Dopo ventiquattro ore dal trattamento, le cellule esposte a CNF1 risultano multinucleate (**b**), mentre quelle di controllo rimangono a singolo nucleo (**a**).

4.2 Il CNF1 induce la degenerazione delle cellule di glioma GL261 entro 15 giorni dal trattamento

Risultato evidente che il CNF1 ha un effetto che si manifesta immediatamente come multinucleazione, si è voluto quindi analizzare l'effetto della tossina sulla sopravvivenza delle cellule di glioma ad essa sottoposte.

Con un saggio di sopravvivenza, ho seguito la sopravvivenza delle cellule esposte a CNF1 nei giorni successivi all'applicazione della tossina.

Le cellule sono state contate e piastrate in pozzetti di piastre da 24 con una densità nota. Quindi sono state trattate con CNF1. Dopo nove giorni e quindici giorni si è effettuata la conta delle cellule nei pozzetti.

Il numero di cellule sopravvissute risultante è stato riportato come valore percentuale rispetto al numero iniziale di cellule nel grafico in Figura 6.

Dal grafico appare evidente che il CNF1 ha dapprima un effetto citostatico sulle cellule di glioma in divisione. Infatti nel periodo che va dal trattamento a nove giorni dopo, le cellule rimangono sostanzialmente invariate in numero, nonostante ci siano già quelle alterazioni visualizzate in precedenza come multinucleazione.

In seguito, fra i nove e i quindici giorni dopo l'esposizione a CNF1, le cellule GL261 subiscono un calo drastico in numero. Questo indica che dopo un certo tempo, le cellule iniziano a degenerare e a morire. Si può ipotizzare che in questo lasso di tempo entrino in gioco dei meccanismi che portano la cellula alla morte.

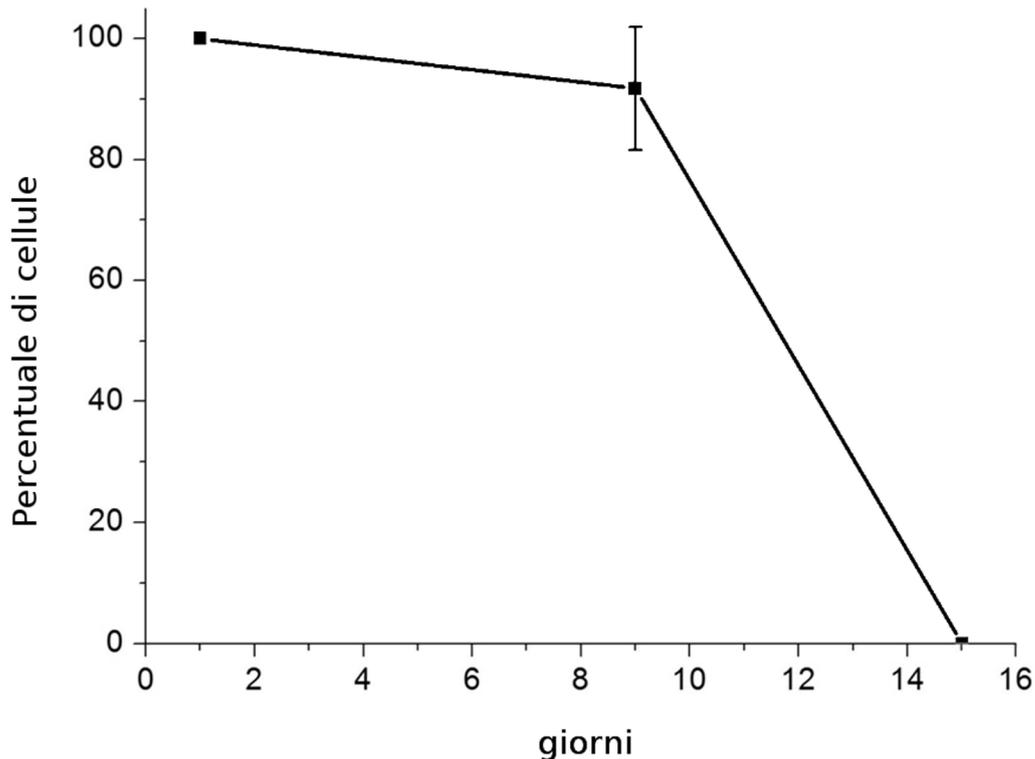


Figura 6 Sopravvivenza delle cellule GL261 trattate con CNF1 dopo 9 e 15 giorni. Prima si osserva un effetto citostatico, seguito da degenerazione fra i 9 e i 15 giorni.

4.3 Meccanismi di morte cellulare indotti dal CNF1

Sono state fatte varie ipotesi riguardo al meccanismo che porta le cellule alla morte.

I meccanismi dapprima indagati sono stati la necrosi e l'apoptosi.

Si è utilizzato un test di annexina e ioduro di propidio (PI) per valutare quante cellule andavano incontro a ciascuno di questi due tipi di morte.

L'annexina è una proteina che lega le molecole di fosfatidilserina esposti sulla membrana che viene resa fluorescente tramite legame con un fluoroforo e quindi colora le cellule apoptotiche.

Invece lo ioduro di propidio rende visibili le cellule che hanno perso l'integrità di membrana, quindi cellule necrotiche o in fasi tardive di apoptosi.

Le cellule di glioma GL261 sono state trattate con CNF1 o soluzione di controllo (tampone TRIS); quindi 10 giorni dopo, sono state trattate con entrambi i reagenti del kit annexina/PI (che possono essere utilizzati contemporaneamente, avendo emissioni differenti) e sono state analizzate con un microscopio a fluorescenza.

Si è analizzato questo intervallo di tempo perché si era visto negli esperimenti precedenti che questo era il periodo in cui le cellule si trovano in una fase di morte cellulare, mentre precocemente la tossina ha un effetto principalmente citostatico.

I dati ottenuti permettono di escludere l'apoptosi come causa di morte, dato che ci sono poche cellule trattate con CNF1 che sono positive all'annexina. Invece sono significativamente di più le cellule positive al propidio (ANOVA a una via seguita da test di Holm-Sidak, $p > 0,05$; Figura 7). Il propidio può essere anche un marcatore di apoptosi tardiva, ma è da notare che in questo caso, la marcatura per il PI è decisamente maggiore della marcatura con l'annexina, rendendo improbabile l'ipotesi di una morte per apoptosi.

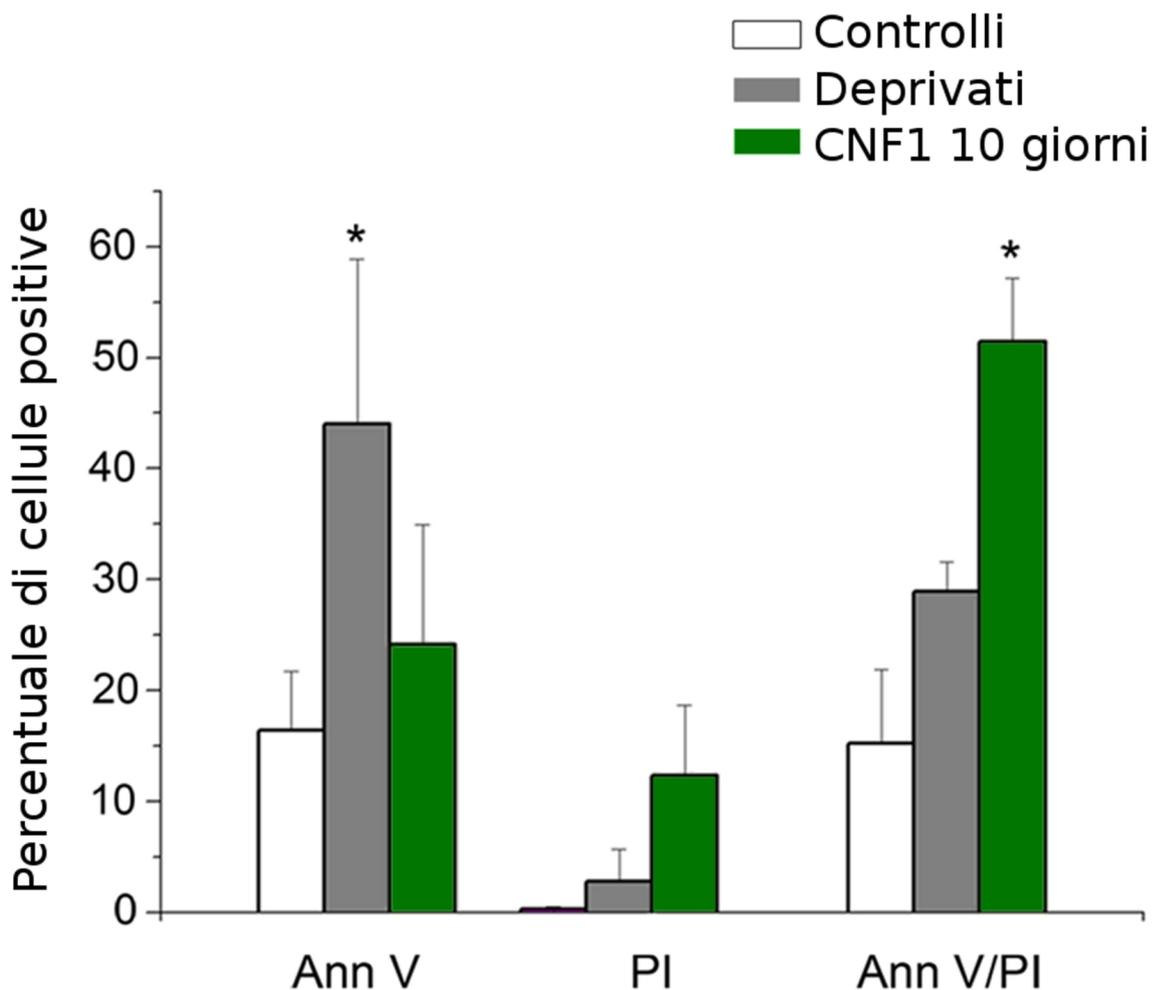


Figura 7 L'annexina colora le cellule apoptotiche di controllo (cellule deprivate di siero) ma non colora in modo significativo le cellule trattate con CNF1. Invece il propidio colora le cellule trattate con CNF1 in modo significativo.

Anche la marcatura con il PI però non è completa: rimane una porzione importante di cellule che non si colorano con il propidio.

Probabilmente la necrosi rappresenta in parte i processi che avvengono in queste cellule, ma da sola non basta a spiegare cosa succede alle cellule dopo il trattamento con CNF1.

Ci devono essere altri fenomeni che portano le cellule a morire.

Un'ipotesi fatta è che le cellule trattate con CNF1 vadano incontro a senescenza.

Infatti le cellule di glioma trattate con CNF1 acquisiscono una morfologia caratteristica delle cellule che vanno incontro a senescenza: perdono la loro forma affusolata e diventano più grandi e appiattite (Figura 8).

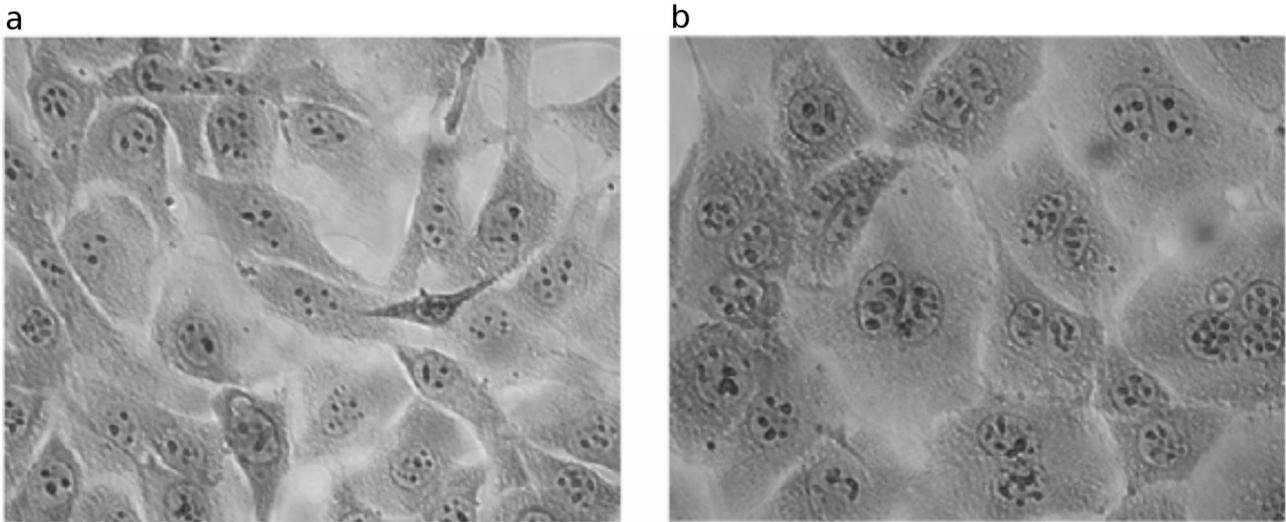


Figura 8 Le cellule di glioma GL261 hanno una normalmente forma affusolata (a). Quando sono esposte a CNF1, assumono una forma caratteristica delle cellule senescenti, più estesa e appiattita (b).

Per esplorare questa possibilità, sono stati fatti dei test per l'attività della beta-galattosidasi, che è un marker di senescenza.

Le cellule di glioma GL261 sono state incubate con CNF1 o soluzione di controllo (tampone TRIS) e quindi, dopo una settimana sono state analizzate con un kit per l'attività della beta-galattosidasi.

Le cellule trattate con CNF1 sono risultate positive rispetto alle cellule non trattate, che invece non presentano alcuna attività beta-galattosidasica (Figura 9).

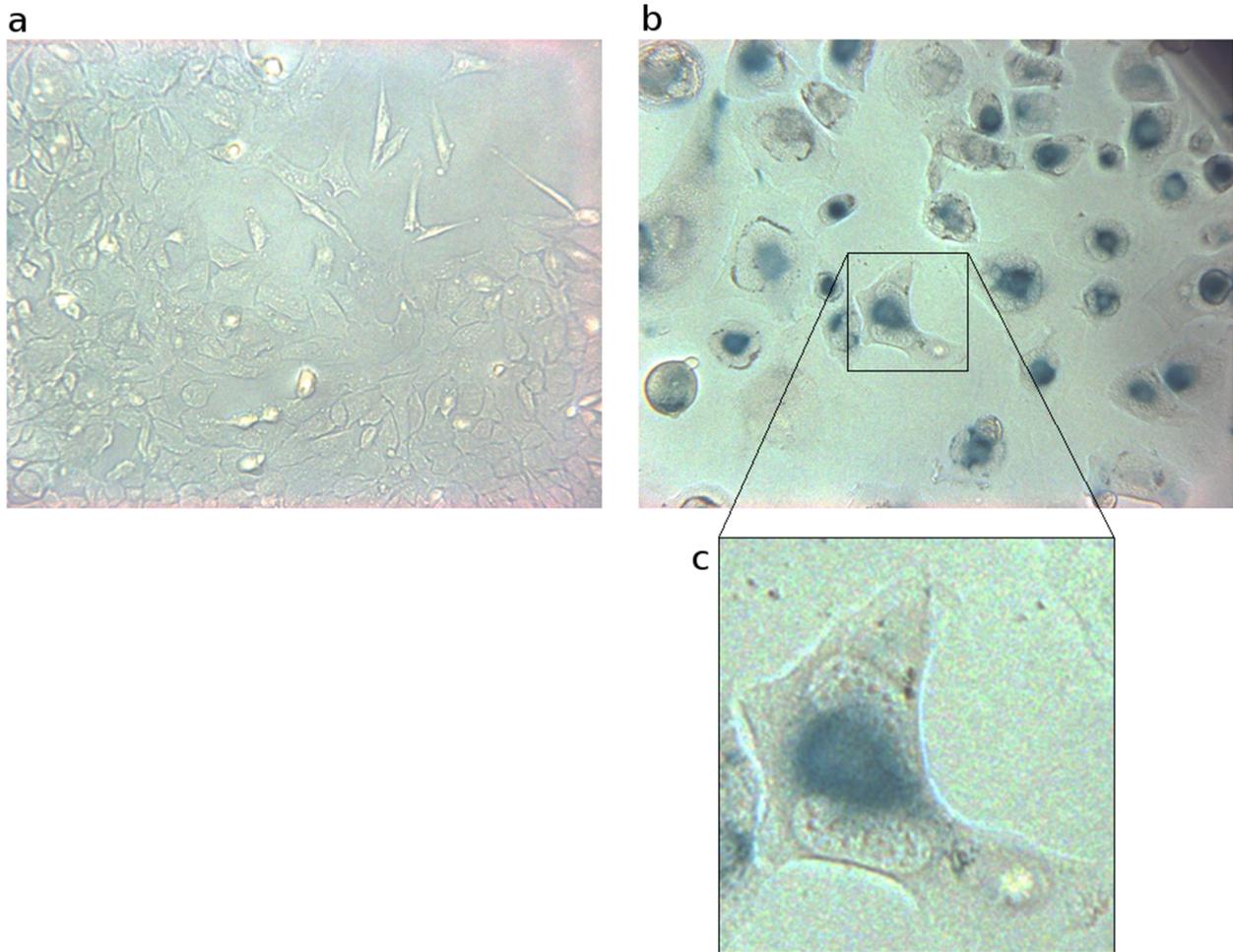


Figura 9 Cellule GL261 non trattate **(a)** non si colorano con li test per la beta-galattosidasi. Invece le cellule GL261 trattate con CNF1 si colorano, risultando così positive all'attività beta-galattosidasi **(b)**. In basso **(c)** si può osservare il dettaglio di una cellula trattata con CNF1 e positiva alla beta-galattosidasi, con la tipica morfologia di una cellula senescente.

Questi risultati validano l'ipotesi che il CNF1 induce senescenza nelle cellule di glioma GL261, anche se la prova finale della senescenza dovrebbe essere poi ottenuta tramite PCR per un set di marcatori di senescenza.

Il risultato riguardante il tipo di morte a cui vanno incontro le cellule di glioma esposte *in vitro* a CNF1 è importante e potrà essere importante indagare ulteriormente, per accertare la predominanza della senescenza.

4.4 Induzione di una massa tumorale nella corteccia visiva di topo

Dopo queste analisi *in vitro*, si è voluto spostare l'attenzione su cosa succeda *in vivo* a delle cellule di glioma esposte al CNF1. Infatti, pensando a un'eventuale futura applicazione della tossina CNF1 per la terapia del glioma nell'uomo, oltre a una caratterizzazione della morte cellulare del glioma

esposto alla tossina (importante, ma forse secondario da un punto di vista applicativo), è fondamentale testare il CNF1 su un glioma di un organismo vivo.

In un organismo, il problema di uccidere le cellule tumorali di glioma diventa estremamente più complesso. Per prima cosa, il glioma risiede a livello di sistema nervoso centrale, quindi perché un farmaco lo possa raggiungere deve essere iniettato direttamente in sede oppure deve possedere la capacità di superare la barriera ematoencefalica. Inoltre, il farmaco deve avere effetto in un range di dosi (finestra terapeutica) che non siano eccessivamente tossiche per l'organismo in cui si vuole debellare il glioma.

In un modello *in vivo* poi, il glioma si trova a interagire con vari tipi cellulari dell'organismo, in modo simile (sperabilmente) a come avviene nell'uomo: le cellule di glioma interagiscono con il sistema immunitario dell'organismo e con le cellule vicine. Una di queste interazioni porta ad esempio il glioma a invadere i tessuti circostanti. Questo aspetto pure complica la terapia della malattia: il glioma si può rimuovere chirurgicamente e si può applicare nella lesione un farmaco chemioterapico, però rimangono foci replicativi di cellule di glioma che si sono infiltrate nel tessuto sano circostante, che possono essere abbastanza lontani dalla lesione chirurgica per non essere raggiunte da dosi sufficienti di farmaco.

Per tutti questi motivi, è stato necessario utilizzare un modello *in vivo* di glioma, ottenuto iniettando le cellule di glioma GL261 nella corteccia visiva primaria di topi singenici con le cellule.

La corteccia visiva è stata scelta per la possibilità di monitorare la funzionalità delle aree adiacenti alla sede del glioma tramite analisi elettrofisiologica, come la misura dei potenziali evocati da stimoli visivi (VEP).

Questo modello presenta il vantaggio di utilizzare topi immunocompetenti e quindi avere quelle interazioni fra glioma e sistema immunitario, che sono rappresentative di quello che si può avere anche nell'uomo. Inoltre il modello presenta un certo grado di invasività delle cellule tumorali nel tessuto circostante, come si può avere nel caso del glioblastoma multiforme umano.

In seguito all'iniezione delle cellule GL261, il glioma segue uno sviluppo in dimensione, dovuto alla proliferazione cellulare nel tumore.

Quindi i primi esperimenti sono stati volti a quantificare la crescita del glioma nel tempo.

Per farlo, i topi in cui sono state iniettate le cellule di glioma sono stati sacrificati in giorni diversi dopo l'iniezione, sono stati perfusi con paraformaldeide 4% e ne è stato estratto l'encefalo fissato. Quindi l'encefalo è stato post-fissato in paraformaldeide 4%, disidratato in soluzione di saccarosio al 30% e quindi è stato congelato e tagliato al microtomo. Le fettine di encefalo sono state colorate

in Hoechst, sono state analizzate al microscopio a fluorescenza, è stata misurata l'area del tumore su ogni fettina per ottenere l'area tumorale totale di ogni topo (proporzionale al volume totale della massa tumorale) che si può vedere in Figura 10.

Mentre a 14 giorni, la massa tumorale è difficilmente rilevabile al microscopio, dopo 21 giorni dall'iniezione delle cellule di glioma, la massa tumorale si può distinguere facilmente e risulta spesso visibile anche a occhio nudo sulla superficie della corteccia visiva durante il processo di estrazione dell'encefalo.

Dopo 28 giorni dall'iniezione del tumore, la massa tumorale diventa molto grande, tanto da comprimere i tessuti sottostanti come il mesencefalo. Questo punto temporale corrisponde anche alla sopravvivenza mediana dei topi con glioma GL261.

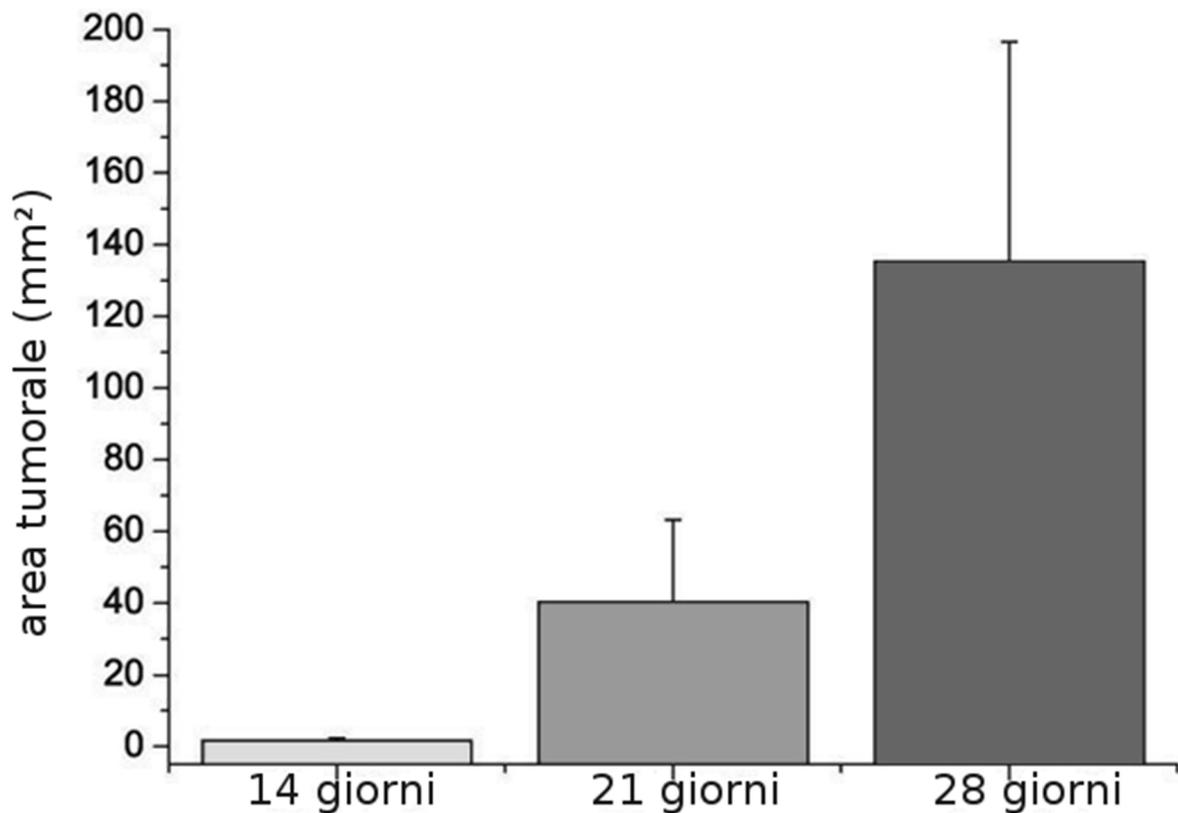


Figura 10 L'area tumorale totale media è ancora piuttosto piccola dopo 14 giorni dall'iniezione delle cellule GL261, ma dopo 21 giorni è già significativamente più grande.

4.5 Il trattamento con CNF1 2 nM prolunga la sopravvivenza dei topi iniettati con cellule GL261

Stabilito lo sviluppo del tumore nei giorni successivi l'iniezione delle cellule GL261, si è deciso di iniettare il CNF1 in tre siti vicini nella regione dove si sviluppa il tumore dopo 5 giorni dall'iniezione delle cellule di glioma, quando ancora la massa tumorale è piccola e confinata al sito di iniezione (Figura 11). Come gruppo di controllo si sono usati dei topi che hanno ricevuto iniezione di cellule di glioma, in cui dopo 5 giorni dall'iniezione delle cellule, è stata iniettata una soluzione di controllo (tampone TRIS).



Figura 11 Il protocollo utilizzato per testare il CNF1 in topi che hanno ricevuto iniezione di cellule di glioma. Dopo 5 giorni dall'iniezione delle cellule GL261 viene iniettato il CNF1.

Quindi si è seguita la sopravvivenza dei topi con glioma iniettati con CNF1 ($n = 9$) rispetto alla sopravvivenza dei topi di controllo ($n = 16$).

Quindi è stata tracciata una curva di sopravvivenza percentuale nel tempo, dove la sopravvivenza ha valore 100 nel giorno zero, mentre poi cala di una percentuale proporzionale al numero di topi deceduti ogni giorno (Figura 12a).

Dai dati si può ricavare che l'effetto letale del glioma inizia a essere marcato dai 28 giorni dall'iniezione. Si può inoltre vedere come i topi iniettati con CNF1 arrivino a vivere quasi fino a 60 giorni dall'iniezione delle cellule, mentre nessun topo di controllo vive fino a 40 giorni dall'iniezione.

Le curve di sopravvivenza sono state analizzate con l'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier, un test non parametrico Log Rank, che ha mostrato un aumento significativo della sopravvivenza di topi con glioma trattati con CNF1 rispetto ai controlli, trattati con un tampone (Log Rank test, $p = 0,02$).

Poi sono state riportate le medie fra la sopravvivenza di ogni topo nel gruppo dei topi con glioma iniettato con CNF1 e nel gruppo dei topi con glioma di controllo. Questi due valori sono stati riportati nel diagramma a barre in Figura 12b.

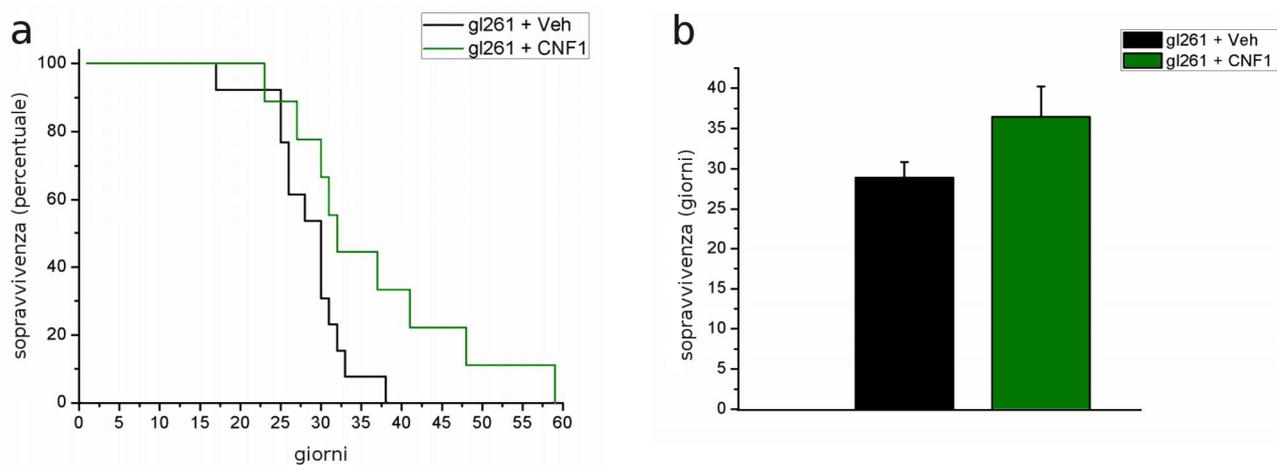


Figura 12 I topi con glioma iniettati con CNF1 sopravvivono più a lungo rispetto a quelli iniettati con soluzione di controllo. A sinistra (a) si può vedere la curva di sopravvivenza percentuale nei giorni. A destra (b) sono confrontate la sopravvivenza media degli animali di controllo (Veh) e degli animali trattati con CNF1, che sopravvivono significativamente di più.

Dai dati si può ricavare che i topi trattati con CNF1 sopravvivono significativamente più a lungo.

Questo esperimento è servito come prova di principio per vedere se il CNF1 possa avere un effetto sull'aumento della sopravvivenza di topi affetti da glioma.

Stabilito questo, era necessario indagare in modo più approfondito l'azione del CNF1 sulla sopravvivenza. Ad esempio l'effetto del CNF1 doveva essere paragonato con farmaci antitumorali classici utilizzati nella terapia del glioma ed era necessario anche testare dosi diverse di CNF1, per stabilire la finestra terapeutica del CNF1, cioè le dosi a cui esso è efficace senza essere eccessivamente tossico per l'animale.

4.6 Effetti di un classico antitumorale: il temozolomide

È stato quindi allestito un esperimento di sopravvivenza per paragonare l'effetto del CNF1 2 nM con quello di un chemioterapico classico, molto utilizzato per il trattamento del glioma, il temozolomide (TMZ).

Si è deciso di somministrare questo farmaco con una mini-pompa osmotica, inserita a livello sottocutaneo, che rilascia il TMZ gradualmente a concentrazione 140 μ M vicino al sito di iniezione (a 1 mm di distanza da esso).

L'infusione di TMZ è mantenuta per una settimana, dal giorno 5 dopo l'iniezione delle cellule di glioma al giorno 12 (Figura 13).

Quindi i topi sono stati monitorati per poi riportare la loro sopravvivenza.

L'analisi è stata effettuata sempre tramite Kaplan-Meier, per poi andare a testare i gruppi a coppie con il test di Holm-Sidak.

Dalla curva di sopravvivenza percentuale nel tempo risulta che sia il temozolomide che il CNF1 aumentano la sopravvivenza dei topi con glioma rispetto ai topi di controllo (Log Rank test, $p = 0,03$; Figura 14a). Se si va a fare il confronto fra le sopravvivenze medie, si ottiene che i topi trattati con TMZ 140 μM ($n = 10$) e CNF1 2 nM sopravvivono significativamente più a lungo dei topi di controllo (Veh; Figura 14b; test di Holm-Sidak; CNF1 2 nM vs. Veicolo, $p = 0,02$; TMZ 140 μM vs. Veicolo, $p = 0,02$). Però le sopravvivenze medie per questi due trattamenti non differiscono in maniera significativa l'una dall'altra (test di Holm-Sidak; CNF1 2 nM vs. TMZ 140 μM , $p = 0,91$).

Inoltre è stata testata anche una dose più elevata di TMZ, che era di 200 μM , non mostrata in figura; quindi sono state testate tre dosi in tutto di TMZ: 20 μM , 140 μM e 200 μM .

La dose più bassa di TMZ, la concentrazione 20 μM ($n = 4$), non sortisce alcun effetto positivo sulla sopravvivenza dei topi affetti da glioma (Figura 14b, barra arancione).

La dose intermedia di TMZ, come già detto, ha effetti paragonabili al CNF1 2 nM.

Invece la dose più alta, il TMZ 200 μM , è risultato eccessivamente tossico e ha portato rapidamente alla morte dei topi (dati non mostrati). Questa dose ha portato i topi alla morte nella prima settimana dall'inizio del trattamento con temozolomide. Questo è stato spiegato con una elevata tossicità del TMZ, che rende inutile (anzi dannoso) aumentare la dose oltre la concentrazione 140 μM .

Ne risulta che, per quanto riguarda il TMZ, la finestra terapeutica nel topo è piuttosto ristretta. Anche considerando la dose efficace di 140 μM , inoltre, l'effetto non si distacca significativamente dall'effetto del CNF1 con concentrazione di 2 nM. Perciò si è pensato di andare a variare la concentrazione di CNF1.

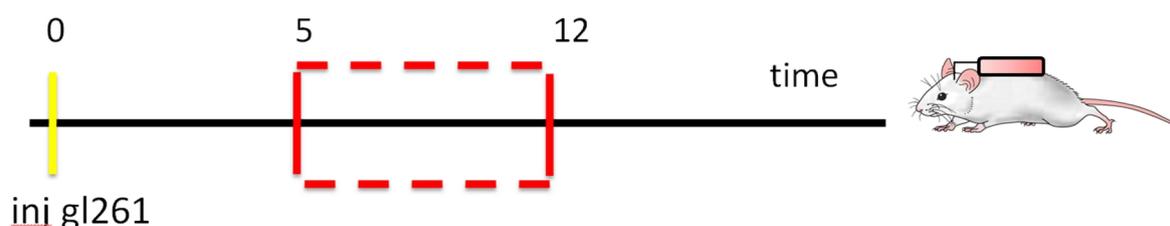


Figura 13 Il protocollo seguito per testare il TMZ. Viene utilizzata una mini-pompa per rilasciare gradualmente il TMZ per una settimana.

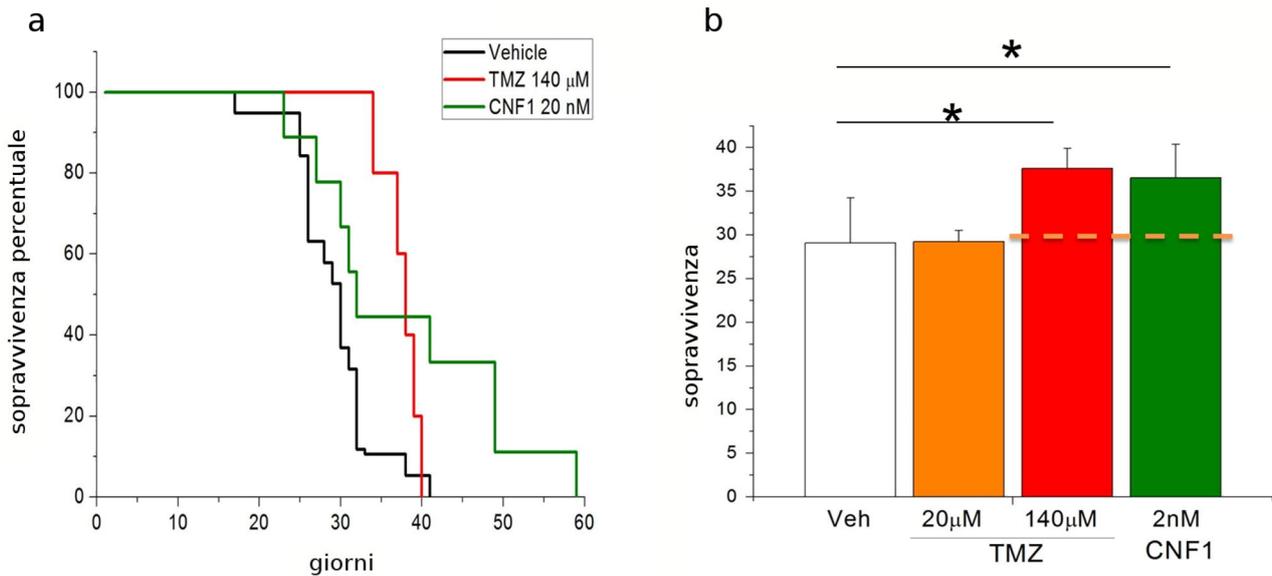


Figura 14 A sinistra (**a**), la sopravvivenza percentuale di topi con glioma che sono trattati con CNF1, temozolomide 140 μ M (TMZ) o soluzione di controllo. A destra (**b**) un diagramma a barre che mostra la differenza significativa fra la sopravvivenza media dei topi con glioma trattati con TMZ 140 μ M e CNF1 e la sopravvivenza dei controlli e i topi trattati con TMZ 20 μ M.

4.7 Effetti del trattamento con CNF1 80 nM

Il CNF1 è stato testato a una dose maggiore di 2 nM sperimentata inizialmente: si è scelta la concentrazione 80 nM (n = 7).

Come per gli esperimenti precedenti, si è iniettato il CNF1 5 giorni dopo l'impianto delle cellule di glioma. Quindi si è seguita la sopravvivenza dei topi.

Il risultato è che i topi sopravvivono significativamente di più dei topi con glioma di controllo e, soprattutto, di più anche rispetto ai topi che hanno ricevuto CNF1 2 nM o TMZ 140 μ M (analisi di Kaplan-Meier; CNF1 80 nM vs. Veicolo, test Log Rank, $p < 0,001$; Figura 15).

Quello che risulta da quest'analisi è un potente effetto del CNF1 80 nM di aumento della sopravvivenza. Infatti il 57% dei topi è sopravvissuto per più di 70 giorni dopo il trapianto.

Questo rende molto interessante il CNF1, dato che la finestra terapeutica appare decisamente più ampia rispetto a quella del TMZ.

Il CNF1 sembra poter raggiungere risultati migliori sulla sopravvivenza di topi affetti da glioma rispetto al farmaco classico TMZ e con un minore effetto tossico.

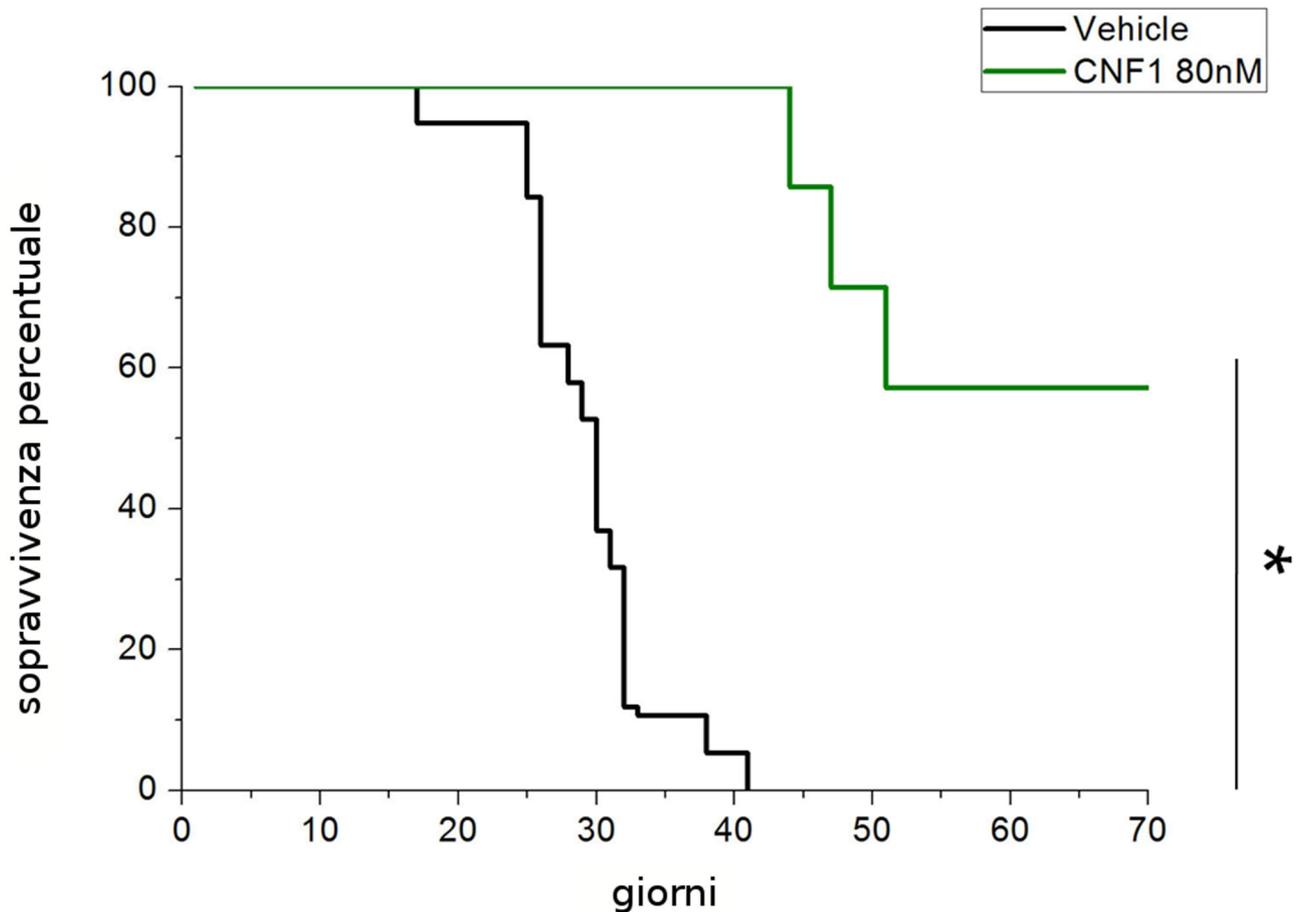


Figura 15 La percentuale di sopravvivenza dei topi con glioma trattati con CNF1 80 nM confrontata con quella di topi con glioma di controllo.

Inoltre, sono stati allestiti gruppi di topi con glioma che sono stati trattati con CNF1 80 nM e sono stati sacrificati a 21 giorni dopo l'impianto delle cellule GL261, perfusi con paraformaldeide 4% e ne è stato prelevato l'encefalo.

L'encefalo, dopo una post-fissazione e una disidratazione in saccarosio 30%, è stato tagliato al microtomo, colorato con Hoechst e analizzato al microscopio a fluorescenza per il calcolo del volume totale della massa tumorale.

È emersa una differenza significativa fra il volume delle masse tumorali di topi che hanno ricevuto iniezione di controllo (tampone; n= 6) e topi che sono stati trattati con CNF1 80 nM (n = 6): i topi trattati presentano un volume tumorale significativamente inferiore (t-test, p = 0,013; Figura 16).

La tossina dunque si conferma efficace non solo sulle cellule di glioma GL261 in coltura, ma anche sul modello di glioma ottenuto iniettando le cellule nei topi.

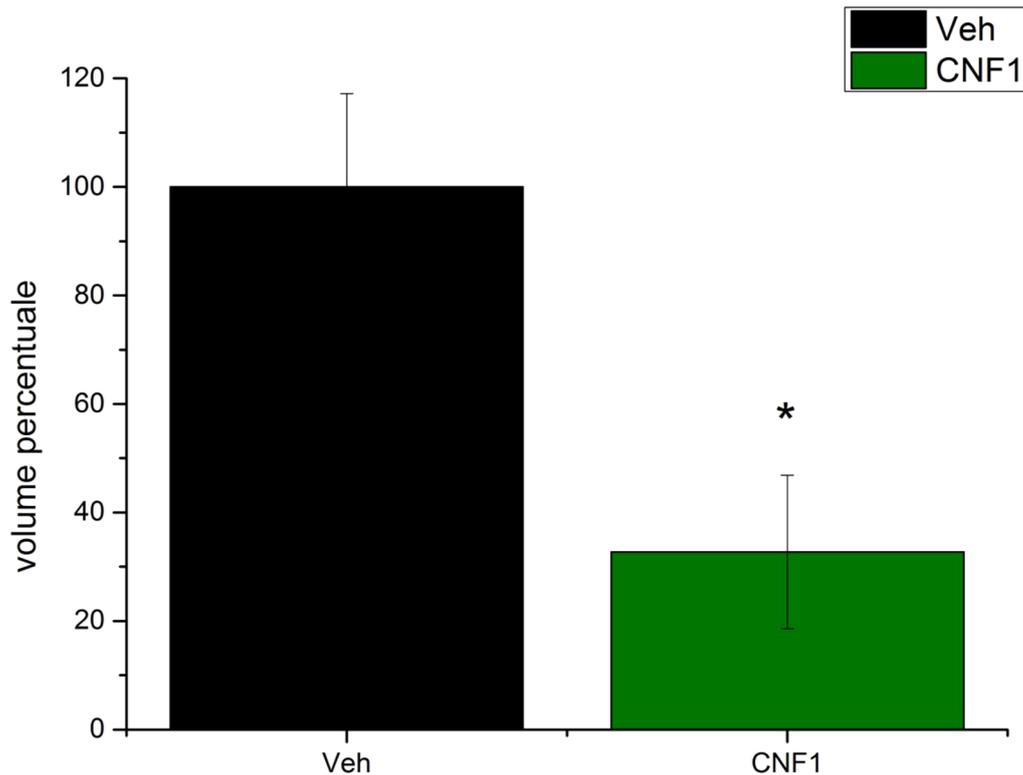


Figura 16 Media normalizzata dei volumi tumorali in topi con glioma che hanno ricevuto soluzione di controllo (Veh) e topi trattati con CNF1. Esiste una differenza significativa fra i due gruppi.

4.8 Marcatura delle strutture neuronali con la colorazione di Golgi

In seguito ai risultati sulla sopravvivenza di topi con glioma trattati con CNF1, ci si è chiesto quale fosse l'effetto della tossina sul tessuto nervoso circostante il tumore. Questa è una domanda di particolare rilievo, perché sappiamo che il CNF1, non solo agisce sulle cellule tumorali inducendone la degenerazione, ma ha un effetto di induzione di fenotipo plastico sui neuroni.

Dato che, notoriamente i neuroni vicini alla massa tumorale sono schiacciati da essa e la loro funzionalità è alterata, è importante capire se il CNF1 può preservare la funzionalità dei neuroni e renderli più responsivi.

Un metodo che si è voluto utilizzare è la colorazione di Golgi. Questa tecnica porta all'impregnazione casuale di alcuni neuroni soltanto, rendendo possibile seguire facilmente i prolungamenti dei neuroni anche su fette di encefalo più spesse (anche 100 μm).

Con questa colorazione si possono facilmente distinguere le spine dendritiche, di cui si può misurare la densità, la morfologia e la lunghezza (Figura 17).

Dai risultati di impregnazione è però emerso un problema che ci ha fatto abbandonare la strada della colorazione di Golgi: con questa tecnica non è poi possibile visualizzare il contorno del tumore e quindi non si può studiare la morfologia dei neuroni che si trovano in vicinanza ad esso e si è dovuto pensare a caratterizzazioni alternative da portare avanti in futuro, come ad esempio l'utilizzo di topi con neuroni che esprimono GFP.

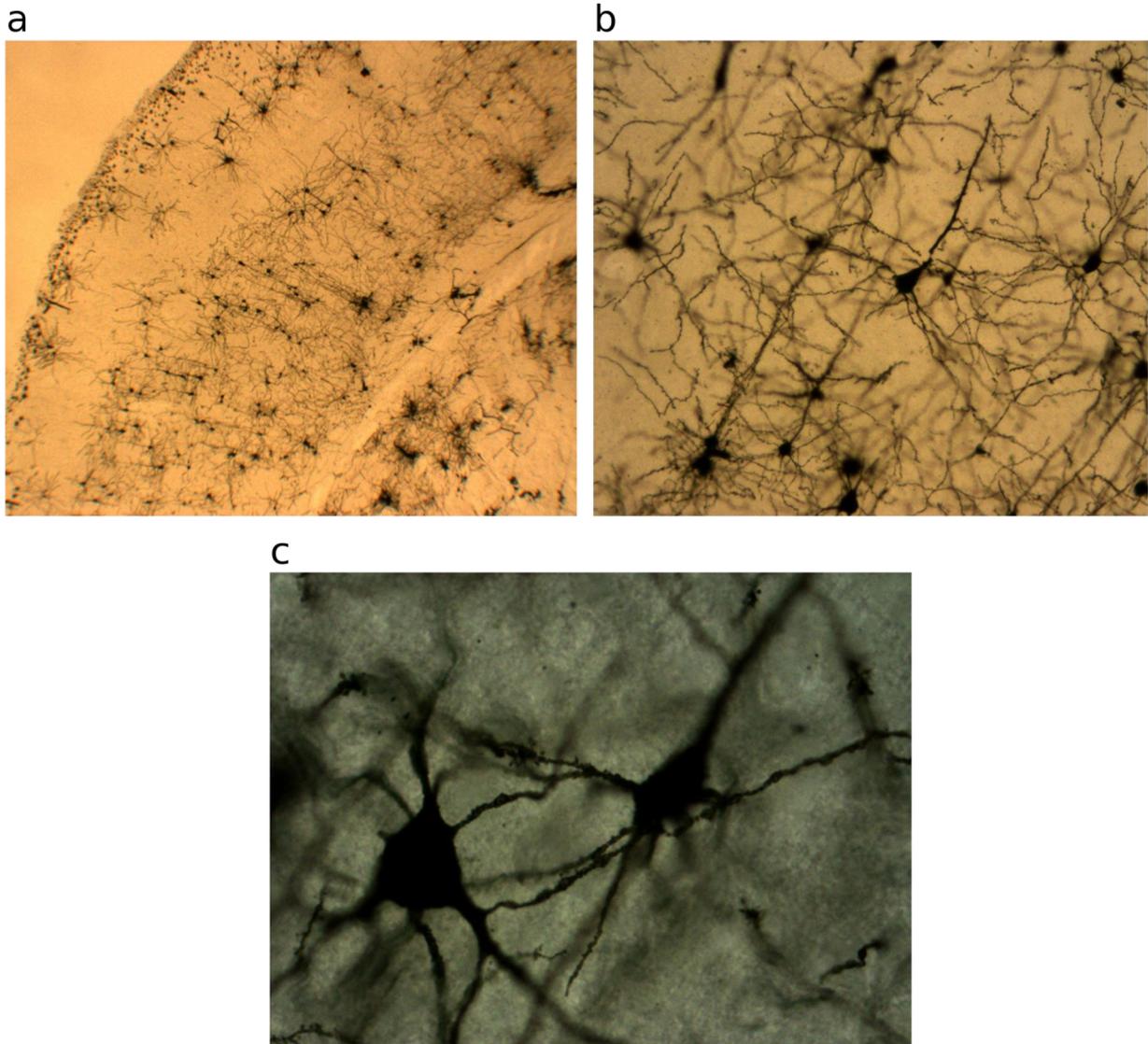


Figura 17 Immagini ottenute da fettine di corteccia di topo impregnate con la colorazione di Golgi. Gli ingrandimenti sono 40x (a), 200x (b) e 1000x (c). Da notare il dettaglio con cui si riescono a visualizzare i neuriti, permettendo analisi delle spine dendritiche e altre analisi morfologiche.

4.9 Analisi elettrofisiologica acuta

Un'altro modo per caratterizzare lo stato del tessuto nervoso circostante il tumore è analizzarlo dal punto di vista elettrofisiologico.

Abbiamo dato inizio a una serie di esperimenti di registrazione elettrofisiologica acuta in configurazione extracellulare nella corteccia visiva del topo.

Qui abbiamo delineato una griglia 3x3 sulla corteccia a fianco del sito di iniezione del tumore.

Le cellule tumorali sono state iniettate a livello di lambda sull'asse anteroposteriore e spostato di 2 mm rispetto a lambda lateralmente. Noi siamo invece andati a misurare un po' più lateralmente rispetto a questo punto: abbiamo registrato in 9 punti di una griglia immaginaria 3x3. Il punto più mediale misurato è a 2,7 mm lateralmente a lambda, mentre il più laterale è a 3,3. Inoltre ci siamo spostati anche sull'asse anteroposteriore, andando fino a 0,5 mm anteriormente e posteriormente a lambda (come indicato nelle mappature in Figura 18).

In questi punti si è andata a fare una mappatura della responsività dei neuroni: si è misurato per ogni punto il rapporto segnale/rumore, dato dal rapporto fra l'ampiezza della risposta a stimoli ad alto contrasto e la risposta a stimoli neutri a contrasto nullo.

Una volta terminata questa mappatura, si è andati nel punto più vicino al tumore da cui si otteneva una risposta chiara agli stimoli e qui si è cercato di determinare diversi parametri:

1. Si è misurata l'acuità visiva, cioè si è verificato quale sia la massima frequenza spaziale in grado di indurre un VEP.
2. Si è misurata la soglia di contrasto, cioè il contrasto minimo che deve avere uno stimolo per produrre un VEP.
3. Si è misurata la risoluzione temporale, quindi quale sia la frequenza temporale massima di uno stimolo che induce risposta nelle cellule.

L'idea è che, ripetendo queste registrazioni in topi con glioma di controllo e trattati con CNF1, si trovi una differenza in uno o più di questi parametri.

Ancora non si è effettuato un numero sufficiente di esperimenti di questo tipo tale da rilevare differenze statisticamente rilevanti. Mostro dunque soltanto due grafici della mappatura dei rapporti segnale/rumore misurati in un topo con glioma trattato con CNF1 e un topo con glioma di controllo (Figura 18).

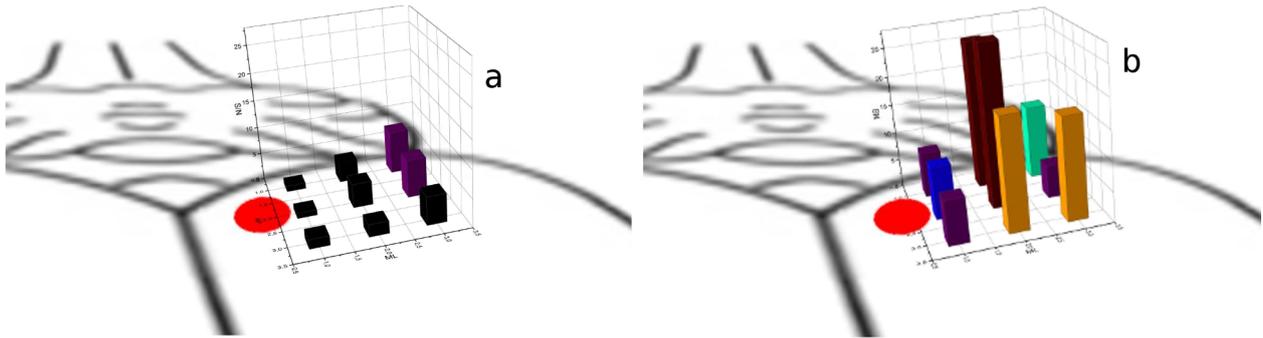


Figura 18 Due grafici ottenuti dalle prime analisi elettrofisiologiche. A sinistra (**a**) la mappatura dei rapporti segnale/rumore in un topo con glioma di controllo. A destra (**b**) la mappatura dei rapporti segnale/rumore in un topo trattato con CNF1. In rosso è evidenziata l'area di iniezione del tumore. L'immagine è costruita per dare un'idea generale dell'esperimento e non è un scala.

4.10 Analisi elettrofisiologica cronica

Inoltre sono stati prodotti dei topi con un elettrodo in configurazione extracellulare impiantato cronicamente nella corteccia visiva, in prossimità dell'area di iniezione del tumore.

Questi impianti permettono di misurare longitudinalmente nel tempo la funzionalità della corteccia. Infatti gli stessi parametri di cui ho parlato riguardo alla registrazione in acuto possono essere valutati ogni giorno nello stesso animale grazie agli impianti cronici.

Ovviamente anche questi impianti hanno dei limiti di durata. Questo è dovuto in parte a stress meccanici che possono coinvolgere l'impianto e in parte alla risposta fisiologica immunitaria del topo, la cui microglia può circondare l'elettrodo, in quanto corpo estraneo, e isolarlo elettricamente.

Primi risultati di registrazioni sono già stati ottenuti, anche se il numero di animali utilizzato è ancora basso e perciò non si può apprezzare ancora alcuna differenza significativa. In Figura 19 si può seguire un esempio dei dati che è possibile ricavare da questo esperimento; vengono paragonate le ampiezze dei VEP in risposta a stimoli ad elevato contrasto (stimoli massimali) in animali sani con topi che invece hanno ricevuto iniezione di cellule GL261 nella corteccia visiva.

Si può ipotizzare una tendenza dei topi con glioma a perdere rapidamente capacità di rispondere nell'area registrata, ma i risultati non sono ancora stati confermati.

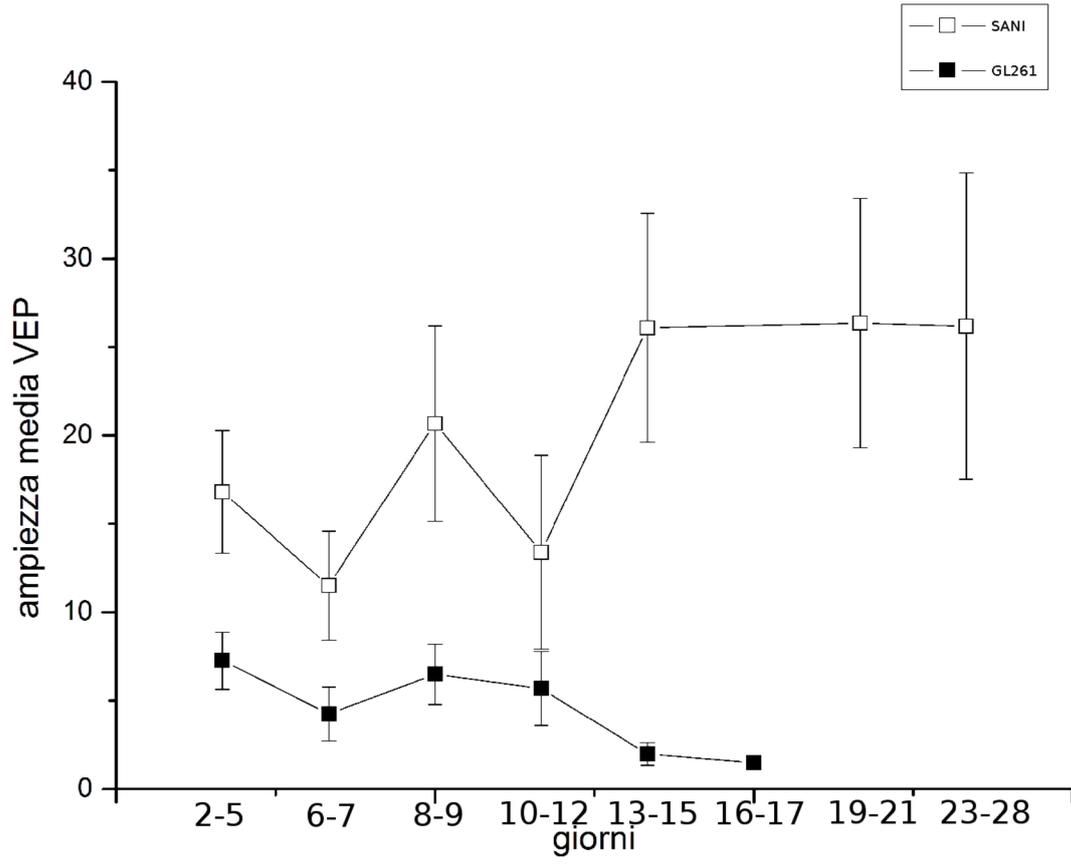


Figura 19 Ampiezza dei VEP in risposta a stimoli ad elevato contrasto in topi sani e in topi con glioma.

5 DISCUSSIONE

Nel corso della mia tesi ho assistito alla messa a punto di un modello di topo utilizzato per testare la tossina CNF1 come ipotetica nuova terapia per i tumori cerebrali dalla fase di sperimentazione *in vitro* sino al passaggio al modello animale *in vivo* vero e proprio.

5.1 Analisi *in vitro*

Nella fase *in vitro* ho constatato l'efficacia del CNF1 nell'indurre un effetto dapprima citostatico nelle cellule di glioma GL261 e poi un effetto di degenerazione cellulare.

Da questo punto di vista, si è esclusa l'apoptosi come meccanismo di morte grazie al test dell'annexina/propidio, che ha anche rivelato una parziale necrosi nelle cellule GL261 trattate con CNF1. Indagando in modo più approfondito i meccanismi di morte cellulare delle GL261, il test per la beta-galattosidasi ha marcato la quasi totalità delle cellule, indicando la presenza di senescenza. Essendo la senescenza un meccanismo molto complesso, per convalidare questi risultati sarà sicuramente opportuno effettuare un microarray per rivelare altri marcatori tipici della senescenza, come ad esempio p15^{INK4b}, DCR2 e DEC1.³²

Una volta fatto questo, un ulteriore studio *in vitro* che si può fare riguarda i meccanismi che portano la cellula in senescenza. Ci si potrebbe chiedere per esempio quali sono i fattori coinvolti nell'induzione. Forse potrebbe trattarsi di fattori coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, dato che questo viene interrotto dalla tossina.

Un altro aspetto da verificare per quanto riguarda le colture di glioma umano. Infatti si potrebbero utilizzare i gliomi umani rimossi con resezione chirurgica e trattarli con CNF1 e verificare a quale destino vanno incontro le cellule, utilizzando gli stessi test visti anche per le cellule murine. Infatti in laboratorio abbiamo già effettuato un trattamento di espianti di glioma umani con CNF1 e abbiamo stabilito che si ha un effetto di multinucleazione, come era stato visto con le cellule GL261. Sono in corso anche tentativi per ottenere da cellule di glioma umano in coltura stabile a partire dalle resezioni chirurgiche.

Una linea stabile umana è molto utile, dato che proverrebbe direttamente da casi reali di glioma. Ciononostante questo non significa che colture cellulari di glioma umano hanno delle limitazioni. Infatti un primo problema è che i passaggi in coltura tendono a selezionare alcune cellule e a rendere quindi omogenea la coltura. Invece in un glioma umano, come d'altronde in gran parte dei tumori solidi primari, si ritrova una grande eterogeneità di cellule tumorali. Questa eterogeneità è

dovuta alla grande quantità di aberrazioni genetiche che si ritrovano nelle cellule tumorali, che portano ad un genotipo instabile e quindi a generare per mitosi delle cellule geneticamente differenti. Inoltre le colture di glioma umano hanno ovviamente limitazioni dovute al fatto di essere *in vitro* e non inserite in un organismo.

E, come già spiegato, i problemi non vengono risolti iniettando le cellule di glioma umano in un topo immunosoppresso, dato che a quel punto si perde rappresentatività per altri motivi, come la mancata interazione fra il glioma e il sistema immunitario dell'organismo.

5.2 Analisi *in vivo*

Perciò, mentre le colture di cellule di glioma umano possono risultare molto utili per delle analisi *in vitro*, caratterizzazione biochimica e analisi molecolari, il modello murino ottenuto tramite iniezione delle cellule GL261 nella corteccia rappresenta invece un ottimo modello *in vivo* di glioma.

I risultati ottenuti finora nel modello *in vivo* di glioma indicano che il CNF1 è efficace nel prolungare la sopravvivenza di topi affetti da glioma, soprattutto quando utilizzato in concentrazione 80 nM.

Soprattutto è interessante se si paragona con l'aumento di sopravvivenza dovuto al temozolomide, considerato uno standard nella terapia del glioma umano.

Quello che emerge è una differenza notevole: alla più alta dose efficace, il temozolomide è paragonabile ad una dose bassa di CNF1 (2 nM). Se si prova ad aumentare la dose di TMZ, la sopravvivenza dei topi cala drasticamente per l'effetto tossico del farmaco, che è molto potente nel portare rapidamente alla morte tutte le cellule in attiva divisione.

Invece il CNF1 può essere aumentato di molto senza effetti drastici: una concentrazione 80 nM (di quaranta volte superiore alla concentrazione usata inizialmente) è assai efficace nel prolungare la vita dei topi affetti da glioma.

Questa ampia finestra terapeutica è promettente per un'eventuale futura applicazione all'uomo del CNF1, fosse anche solo per diminuire la quantità di TMZ da somministrare ai pazienti.

Inoltre il CNF1 ha un effetto long-lasting,⁴⁴ mentre il TMZ deve essere somministrato continuamente.

L'effetto del CNF1 80 nM sulla sopravvivenza è concorde con l'effetto del CNF1 sul volume della massa tumorale nei topi. Infatti il volume è ridotto significativamente nei topi trattati con la tossina. Questo può essere spiegato in vari modi. Ad esempio si può ipotizzare che l'effetto sia dovuto alla sola azione diretta della tossina sulle cellule tumorali, dato che si è visto che il CNF1 da solo è in grado di far degenerare cellule in coltura. Però potrebbe anche darsi che il CNF1 abbia solo un effetto citostatico in vivo e la riduzione del volume sia dovuta soltanto al sistema immunitario dell'organismo. Nulla esclude che entrambi i meccanismi diano un contributo.

In effetti una delle analisi che si vogliono effettuare prossimamente è proprio verificare, tramite analisi immunoistochimica, il reclutamento di macrofagi (microglia) e linfociti T nell'area tumorale e peritumorale in topi con glioma GL261 trattati con CNF1 e topi con glioma di controllo.

Inoltre l'effetto del CNF1 sul citoscheletro delle cellule bersaglio le rende immobili e quindi potrebbe rendere le cellule tumorali meno capaci d'infiltrare i tessuti circostanti. Questo può essere rilevante nel trattamento del glioma, dato che una delle caratteristiche che rendono particolarmente letale il glioblastoma è la sua elevata invasività. Infatti le Rho GTPasi sono state correlate in svariati studi con la capacità di migrazione delle cellule tumorali.^{56,57}

Un limite delle analisi di sopravvivenza e del volume tumorale effettuate è che il tumore viene trattato in fasi molto iniziali. Questo ovviamente è scarsamente rappresentativo del caso umano, in cui il tumore viene solitamente diagnosticato quando già piuttosto sviluppato.

Dei futuri esperimenti potrebbero vedere l'applicazione della tossina CNF1 in topi con glioma ad uno stadio di sviluppo più avanzato, come 10 o 15 giorni.

A questo proposito, sarebbe interessante seguire longitudinalmente l'evoluzione della massa tumorale con tecniche quali la microPET o la risonanza magnetica per piccoli animali. Queste tecniche permetterebbero anche di vedere come cambia l'evoluzione del tumore dopo trattamenti con CNF1 a 10 o 15 giorni.^{58,59}

In letteratura si possono già trovare altri casi in cui si è sperimentato, su modelli animali, l'utilizzo di tossine batteriche per il trattamento di tumori. In alcuni casi si è utilizzata una porzione di tossina per trasportare molecole che contrastino la crescita tumorale all'interno delle cellule, come nel caso della tossina botulinica C2, di cui si è utilizzato un dominio geneticamente mutato (C2IN, che media l'ingresso nelle cellule) che è stato fuso con il gene p53 (uno dei geni soppressori tumorali più frequentemente mutati nelle cellule tumorali), per ottenere una proteina p53 capace di penetrare nelle cellule tumorali e qui esercitare la sua funzione.⁶⁰

In altri casi si è sfruttata l'attività enzimatica di tossine batteriche per inibire la crescita tumorale. Un esempio di questo sono degli studi effettuati sulle tossine Shiga, prodotte da *Shigella dysenteriae* e alcuni ceppi di *E. coli*. Queste tossine inibiscono la sintesi proteica nelle cellule bersaglio inattivando i ribosomi e potrebbero indurre segnali che portano le cellule all'apoptosi.⁶¹

Nella tesi ho anche iniziato a valutare lo stato della corteccia peritumorale.

Infatti la corteccia che circonda il tumore, viene da esso compressa e invasa e quindi presenta diverse alterazioni. Un risultato di queste alterazioni è noto dalla letteratura dei gliomi umani: l'epilessia, che frequentemente si sviluppa nei pazienti di un glioblastoma.^{62,63,64}

Quello che si dovrà fare è capire quali sono le alterazioni funzionali della corteccia peritumorale tramite analisi elettrofisiologica, sia acuta che cronica.

Sperabilmente, i topi affetti da glioma presenteranno alterazioni di parametri come l'acuità visiva o la soglia di contrasto, mentre i topi trattati con CNF1 potrebbero avere performance migliori.

Questo viene ipotizzato per due motivi: la capacità del CNF1 di fare degenerare le cellule tumorali e la capacità di indurre nei neuroni un fenotipo di tipo plastico.

Questo esperimento deve servire tuttavia anche ad un altro scopo: controllare che queste elevate concentrazioni di CNF1 non abbiano effetti negativi sul tessuto nervoso peritumorale, sempre nell'ottica di una futura possibile applicazione all'uomo.

Sempre pensando all'uomo, un aspetto particolarmente interessante è lo studio dell'epilessia in topi con glioma. Grazie ai tracciati in topi freely-moving con impianto di elettrodi cronico, si può anche cercare un fenotipo epilettico nel potenziale di campo della corteccia di topi affetti da glioma. Se verranno rilevate delle crisi epilettiche, allora sarà interessante andare a fare un confronto fra i topi trattati con CNF1 e quelli trattati con soluzione di controllo. Anche in questo caso, non si può avere certezza sul tipo di effetto che avrà il CNF1, ma sarà importante considerarlo pensando a un'applicazione nell'uomo, che sviluppa spesso epilessia in seguito a glioma.

L'altro aspetto dello studio della corteccia peritumorale è la caratterizzazione morfologica, cioè valutare la morfologia delle cellule nervose che si trovano in prossimità del tumore.

Questo può essere fatto tramite diverse metodologie.

Il primo approccio sperimentato è stato quello della colorazione di Golgi. Questa tecnica permette di visualizzare chiaramente strutture come le spine dendritiche lungo tutta la lunghezza dei dendriti, grazie al fatto che è una colorazione che impregna casualmente soltanto una piccola parte dei neuroni corticali.

Purtroppo il problema riscontrato è che con questa colorazione risulta impossibile visualizzare il contorno della massa tumorale, vanificando quindi l'esperimento. Si è anche cercato senza successo di combinare la colorazione di Golgi con altre colorazioni che permettano la visione del tumore.

Perciò si è cercato di pensare a soluzioni alternative. Una soluzione è iniettare le cellule di glioma GL261 nella corteccia di topi transgenici che esprimono la GFP sotto un promotore neuronale. Questo significa che le fettine di encefalo del topo possono essere trattate con coloranti come l'Hoechst che, rendendo visibili per fluorescenza tutti i nuclei delle cellule, rendono visibile anche la massa tumorale.

In questi topi è la GFP che permette l'analisi morfologica, marcando tutte le porzioni dei neuroni, compresi i neuriti. Quindi, tramite microscopia a fluorescenza, si possono effettuare in questi topi analisi come quella della densità delle spine.

Tutti questi esperimenti sono necessari per delineare un possibile ruolo terapeutico del CNF1 nei casi di glioma.

Però non è sufficiente. Infatti ci sono diverse altre problematiche che devono ancora essere considerate prima di poter pensare a queste applicazioni.

Una problematica è dovuta alla modalità di somministrazione. Il CNF1 nel nostro modello è stato infuso direttamente nella corteccia nel sito esatto di iniezione del glioma e attorno ad esso. Infatti il CNF1 è una proteina, quindi una molecola piuttosto ingombrante e che può essere degradata da proteasi, che potrebbero limitare la sua diffusione attraverso la corteccia. Quindi una prima domanda che potrebbe sorgere è se il CNF1 sia effettivamente efficace nel combattere eventuali foci di cellule tumorali che si trovano a distanza dalla massa tumorale principale.

Poi rimane il problema della somministrazione, che al momento deve essere necessariamente l'infusione intracorticale. Questo è in realtà un problema che riguarda tutti i farmaci che devono raggiungere l'encefalo, dato che il sistema nervoso centrale è protetto dal filtro attivo della barriera ematoencefalica. Per questo, nella ricerca di terapie per il glioma, una delle direzioni prese è la sperimentazione di nanoparticelle, ovvero particelle artificiali nanodimensionali di varia natura che possono essere ricoperte con peptidi, surfattanti o acidi nucleici che permettono loro di penetrare al di là della barriera ematoencefalica. Un'idea, certamente futuristica, ma non implausibile, è riuscire a ottenere delle nanoparticelle che possono essere caricate con dei farmaci, sono in grado di raggiungere un sito bersaglio a livello del sistema nervoso centrale e possono rilasciare qui il farmaco.

In linea di principio, un farmaco per questo utilizzo potrebbe essere proprio il CNF1, che così potrebbe essere somministrato per via sistemica, risolvendo uno dei principali limiti della tossina.

Credo che comunque sia molto importante che il CNF1 continui ad essere sperimentato nell'ambito del trattamento dei tumori del sistema nervoso centrale, dato che ha dimostrato molte potenzialità per l'utilizzo nell'uomo e considerato quanto ci sia necessità di nuove terapie per queste malattie.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Aktories, K., Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 487-98 (2011).
2. Cerri, C. *et al.*, Activation of Rho GTPases triggers structural remodeling and functional plasticity in the adult rat visual cortex. *J. Neurosci.* **31**, 15163-72 (2011).
3. Holland, E. C., Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Genet.* **2**, 120-129 (2001).
4. Chen, L., Zhang, Y., Yang, J., Hagan, J. P. & Li, M., Vertebrate animal models of glioma: Understanding the mechanisms and developing new therapies. *Biochim. Biophys. Acta* **1836**, 158-165 (2013).
5. Louis, D. N., Holland, E. C. & Cairncross, J. G., Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am. J. Pathol.* **159**, 779-86 (2001).
6. Kleihues, P. & Cavenee, W. K. eds., *World Health Organization Classification of Tumors of the Nervous System* (WHO/IARC, Lyon, 2000).
7. Louis, D. N. & Cavenee, W. K., in *Cancer: Principles and Practice of Oncology, ed. 6* (Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001).
8. Louis, D. N. & Gusella, J. F., A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet.* **11**, 412-415 (1995).
9. von Deimling, A. *et al.*, Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* **3**, 19-26 (1993).
10. Watanabe, K. *et al.*, Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* **6**, 217-23 (1996).
11. Cavenee, W. K. *et al.*, in *World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System*, edited by Kleihues, P. & Cavenee, W. K. (IARC/WHO, Lyon, 2000).
12. Rasheed, B. K. A. *et al.*, Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res.* **54**, 1324-1330 (1994).
13. Lang, F. F., Miller, D. C., Koslow, M. & Newcomb, E. W., Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J. Neurosurg.* **81**, 427-36 (1994).
14. Louis, D. N. *et al.*, Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **52**, 31-8 (1993).
15. Reifenberger, J. *et al.*, Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 822-31 (1996).
16. Stupp, R. *et al.*, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987-996 (2005).

17. Kaye, A. H., Morstyn, G., Gardner, I. & Pyke, K., Development of a xenograft glioma model in mouse brain. *Cancer Res.* **46**, 1367-73 (1986).
18. Ponten, J., in *In Human Tumor Cells in Vitro*, edited by Jorgen, F. (Plenum Press, New York, 1975).
19. Houchens, D. P., Ovejera, A. A., Riblet, S. M. & Slagel, D. E., Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **19**, 799-805 (1983).
20. Candolfi, M. *et al.*, Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J. Neurooncol.* **85**, 133-48 (2007).
21. Wen, P. Y. & Kesari, S., Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* **359**, 492-507 (2008).
22. Radaelli, E. *et al.*, Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol. Histopathol.* **24**, 879-91 (2009).
23. Newcomb, E. W. & Zagzag, D., in *The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments*, edited by Van Meir, E. G. (Springer, Dordrecht, 2009), pp. 227-241.
24. Zagzag, D., Miller, D. C., Chiriboga, L., Yee, H. & Newcomb, E. W., Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion in vivo. *Brain Pathol.* **13**, 34-7 (2003).
25. Burger, P. C., Scheithauer, B. W. & Vogel, F. S., *Surgical Pathology of the Nervous System and its Coverings* (Churchill Livingstone, New York, 2002).
26. Ranza, E., Facoetti, A., Morbini, P., Benericetti, E. & Nano, R., Exogenous platelet-derived growth factor (PDGF) induces human astrocytoma cell line proliferation. *Anticancer Res.* **27**, 2161-6 (2007).
27. Shih, A. H. *et al.*, Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis. *Cancer Res.* **64**, 4783-9 (2004).
28. Chemotherapy, I. o. T. o. I. R. d. M. G., Sengupta, S.; Marrinan, J.; Frishman, C.; Sampath, P. *Clin. Dev. Immunol.* **2012** (2012).
29. Mizushima, N., Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **21**, 2861-2873 (2007).
30. Levine, B. & Klionsky, D. J., Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463-477 (2004).
31. Shi, Z. *et al.*, A systems biology analysis of autophagy in cancer therapy. *Cancer Letters* **337**, 149-160 (2013).
32. Bernardes, B. & Blasco, M., Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ. Res.* **111**, 97-109 (2012).

33. Garcia, T. A., Ventura, C. L., Smith, M. A., Merrell, D. S. & O'Brien, A. D., Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin from Uropathogenic *Escherichia coli* Elicit Different Host Responses in the Murine Bladder. *Infect. Immun.* **81**, 99-109 (2013).
34. Boquet, P., Bacterial Toxins Inhibiting or Activating Small GTP-Binding Proteins. *Annals New York Academy of Sciences*, 83-90.
35. Landraud, L. *et al.*, *E. coli* CNF1 toxin: a two-in-one system for host-cell invasion. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 513-518 (2004).
36. Lemonnier, M., Landraud, L. & Lemichez, E., Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 515-534 (2007).
37. Boquet, P., The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon* **39**, 1673-1680 (2001).
38. Knust, Z. & Schmidt, G., Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)—A Growing Toxin Family. *Toxins* **2**, 116-127 (2010).
39. McNichol, B. A., Rasmussen, S. B., Carvalho, H. M., Meysick, K. C. & O'Brien, A. D., Two domains of Cytotoxic necrotizing factor type 1 bind the cellular receptor, Laminin Receptor Precursor Protein. *Infect. Immun.* **75**, 5095-5104 (2007).
40. Blumenthal, B., Hoffmann, C., Aktories, K., Backert, S. & Schmidt, G., The cytotoxic necrotizing factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* bind to different cellular receptors but take the same route to the cytosol. *Infect. Immun.* **75**, 3344-3353 (2007).
41. Mecham, R. P., Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J.* **5**, 2538-2546 (1991).
42. Mills, M., Meysick, K. C. & O'Brien, A. D., Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect. Immun.* **68**, 5869-5880 (2000).
43. Augspach, A. *et al.*, Activation of RhoA,B,C by *Yersinia* Cytotoxic Necrotizing Factor (CNFy) Induces Apoptosis in LNCaP Prostate Cancer. *Toxins* **5** (2013).
44. Diana, G. *et al.*, Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 636-41 (2007).
45. Borrelli, S., Musilli, M., Martino, A. & Diana, G., Long-lasting efficacy of the cognitive enhancer Cytotoxic Necrotizing Factor 1. *Neuropharmacology* **64**, 74-80 (2013).
46. Martino, A. *et al.*, Rho GTPase-dependent plasticity of dendritic spines in the adult brain. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1-11 (2013).
47. Musilli, M., Nicolìa, V., Borrelli, S., Scarpa, S. & Diana, G., Behavioral effects of Rho GTPase modulation in a model of Alzheimer's Disease. *Behav. Brain Res.* **237**, 223-229 (2013).

48. Chishti, M. A. *et al.*, Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J. Biol. Chem.* **276**, 21562-70 (2001).
49. Maillet, M. *et al.*, Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP α . *Nat. Cell Biol.* **5**, 633-9 (2003).
50. Zhou, Y. *et al.*, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. *Science* **302**, 1215-7 (2003).
51. Amir, R. E. *et al.*, Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* **23**, 185-188 (1999).
52. Belichenko, P. V. *et al.*, Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J. Comp. Neurol.* **514**, 240-258 (2009).
53. Moretti, P. *et al.*, Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurosci.* **26**, 319-327 (2006).
54. De Filippis, B. *et al.*, Phenotype and reverses astrocytic Deficits in a mouse model of Rett syndrome. *Neuropsychopharmacology* **37**, 1152-1163 (2012).
55. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J., *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2012).
56. O'Connor, K. L. & Chen, M., Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* **4**, 1-7 (2013).
57. Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G., Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* **147**, 1009-1022 (1999).
58. Lyons, S. K., Advances in imaging mouse tumour models in vivo. *J. Pathol.* **205**, 194-205 (2005).
59. Doblas, S. *et al.*, Glioma morphology and tumor-induced vascular alterations revealed in seven rodent glioma models by in vivo magnetic resonance imaging and angiography. *J. Magn. Reson. Imaging* **32**, 267-275 (2010).
60. Fahrer, J., Rausch, J. & Barth, H., A cell-permeable fusion protein based on Clostridium botulinum C2 toxin for delivery of p53 tumorsuppressor into cancer cells. *PLOS ONE* **8**, 1-9 (2013).
61. Bergan, J., Dyve Lingelem, A. B., Simm, R., Skotland, T. & Sandvig, K., Shiga Toxins. *Toxicon* **60**, 1085-1107 (2012).
62. Campbell, S. L., Buckingham, S. C. & Sontheimer, H., Human glioma cells induce hyperexcitability in cortical networks. *Epilepsia* **53**, 1360-1370 (2012).

63. Mortati, K. A., Arnedo, V., Post, N., Jimenez, E. & Grant, A. C., Sutton's law in epilepsy: Because that is where the lesion is. *Epilepsy & Behavior* **24**, 279-282 (2012).
64. Mittal, S., Oni-Orisan, A., Stenz, J. & Shah, A. K., Temporal neocortical origin of pilomotor seizures in association with an infiltrating glioma: a case confirmed by intracranial electroencephalography monitoring. *J. Neurosurg.* **113**, 388-393 (2010).