

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

Dottorato di ricerca in Biotecnologie

XXVI Ciclo – ANNI 2011- 2013

ANTITUMORIGENICITÀ DEL D-RIBOSIO E KHCO_3 SULLA
LINEA DI CARCINOMA MAMMARIO UMANO Hs 578T ED
EFFETTI SULLA LINEA D'EPITELIO MAMMARIO UMANO
NON TUMORALE Hs 578BST

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Relatore:

Chiar.ma Prof. Simonetta Croci

Dottorando:

dott Luca Bruni

SUMMARY

The aim of this work is to study how the cell proliferation, chemoinvasive and migration potential could be modified by K:D-rib treatment, a water solution of D-ribose and KHCO_3 . These features are considered neoplastic hallmarks. K:D-rib could be conceived as food integrator and therefore the goal of this research is a comparative valuation of K:D-rib effects on cancer and not cancer study model, respectively Hs 578T and Hs 578Bst.

The role of D-ribose and potassium ion (K^+) are well known. D-ribose is an aldopentose sugar, assists the energy metabolism of the cell and is a precursor of several amino acids. The K^+ ion is involved in many processes including apoptosis, genesis and maintenance of membrane potential, coordinates and stabilizes the folding of the G-quadruplex .

To test the effect of the K:D-rib on the proliferation of the cell lines we could not use the common metabolic assays (MTT assay , WST -1 assay and so on) as K:D-rib interacts with the bromide tetrazolium reducing it to formazan, by the way demonstrating its antioxidant power. To test the effects of treatment with K:D-rib, we used two distinct cellular models : Hs 578T (human breast carcinoma) and Hs 578Bst (epithelium, human breast, non-tumor) .

The line Hs 578T was maintained in culture and treated with K:D-rib 5 mM for 50 days. The slit number was used to assess the effects of K:D-rib. The control cells were split 16 times while the treated was split 10 times. After that Hs 578T cell line was treated with K:D-rib 5 mM for 14 days and the DP (doubling population time) was calculated. The control showed DP time of 44 hours and the treated had a DP time of 59 hours. These results proved the growth rate significantly different.

This result prompted us to study the effect of K:D-rib on the tumorigenic potential of the line Hs 578T by means the chemotactic invasion assay. The cells were pre-treated with K:D-rib 5 mM for various times, prior to the assay their chemoinvasive potential. During the chemoinvasion assay the K:D-rib treatment went on for 48h; the test duration. This experiment allowed us to affirm that the K:D-rib, at a concentration of 5 mM, interferes with the chemoinvasive potential of cancer cell line Hs-578T by reducing it approximately 80 % in 9 days of treatment.

The uptake of potassium was studied using the DNAzyme as biosensor for measurements of potassium concentration on cell supernatant, before and after treatment of Hs 578T cell line. Preliminary results indicate that the supernatant of Hs 578T treated with K:D-rib 5mM for 48h shows a lower DNAzyme concentration compared to DMEM (only culture medium of the cells) with K:D-rib 5 mM, but higher than the only DMEM (only the ground) and the supernatant of the control (untreated Hs 578T). From these measurements it is possible to demonstrate that there is a cellular uptake of the ion K^+ and that the DNAzima can be used as a biosensor for the ion K^+

In addition using Atomic Force Microscopy the cell line Hs 578T morphology was investigated to understand if it could change by K:D-rib treatment at the concentration of 5 mM. In the case of Hs 578T treated cells a careful analysis shows the presence of cell membrane rearrangement perhaps related to “porosomes structure like”. The majority of these structures are in the perinuclear area of the cells. Not so evident structures are found on not treated cancer cell membrane. It could be speculate of “porosomes structure like” and the membrane invaginations correlated, are the morphology link between hallmark cancer modification and the potassium uptake. By means of the not tumour cells model we studied the effects of K:D-rib 5 mM on the Hs 578Bst cell line (human mammary epithelial cell line) by mean the spit number to valuate the growth rate. After 25 days of treatment the treated cells do not display a relevant decrease of growth rate respect the untreated cells. Having demonstrated the antioxidant role of the K:D-rib, it was decided to study the protective effect of K:D-rib against radiation damage in laboratory by mimicking two sessions of radiotherapy pre-treating the cells with K:D-rib 5 mM. The total dose administered was 4 Gy, fractionated in two dose of 2 Gy each one, in agreement with the conventional treatment protocols for breast cancer radiotherapy. The AFM measurements showed significant damage to cytoskeletal structures associated with the membrane and the membrane itself, following an exposure of 4 Gy. In contrast, cells pre-treated with K:D-rib at the concentration of 5 mM have similar structures to the control avoiding more ionizing radiation effects.

RIASSUNTO

Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare come la proliferazione cellulare ed il potenziale migratorio-invasivo, considerati due “*hallmarks*” della linea cellulare tumorale Hs578T, possano venir modificati dal K:D-Rib, soluzione acquosa di KHCO_3 e D-ribosio. Il K:D-Rib può essere concepito come un integratore alimentare e data la sua natura è stato da subito chiaro che lo scopo di questo studio dovesse essere una valutazione comparata degli effetti su un modello tumorale ed un non tumorale. Il composto è stato quindi testato anche su un modello cellulare non tumorale Hs578Bst con lo stesso approccio: si è investigato l'effetto del K:D-Rib sulla proliferazione cellulare.

Il ruolo del D-ribosio e dello ione potassio (K^+) sono ormai ampiamente noti. Il D-ribosio è un aldopentoso, assiste il metabolismo energetico della cellula oltre ad esser un precursore d'alcuni aminoacidi. Lo ione K^+ è coinvolto in molti processi tra cui apoptosi, genesi e mantenimento del potenziale di membrana, stabilizza e coordina il folding dei G-quadruplex.

Per saggiare l'effetto del K:D-Rib sulla proliferazione delle linee cellulari non ci siamo potuti avvalere dei comuni saggi metabolici (*MTT assay*, *WST-1 assay* ecc) in quanto abbiamo dimostrato che il K:D-Rib interagisce con il bromuro di tetrazolio riducendolo a formazan, così facendo si è dimostrato anche il suo potere antiossidante. Per saggiare gli effetti del trattamento con K:D-Rib, si sono utilizzati due modelli cellulari distinti: Hs 578T (carcinoma mammario umano) ed Hs 578Bst (epitelio, mammario umano, non tumorale).

La linea Hs 578T è stata mantenuta in coltura e trattata con K:D-rib 5 mM per 50 giorni. Il n° di split è stato utilizzato per valutare gli effetti de K:D-rib. Il controllo è stato splittato 16 volte mentre il trattato è stato splittato 10 volte. Si è poi calcolato il DP (*doubling population time*), su un trattamento di 14 giorni ed il controllo ha mostrato un tempo di duplicazione di 44 ore mentre il trattato di 59 ore, tempi significativamente diversi. Questo risultato ci ha spinto a studiare l'effetto del K:D-Rib sul potenziale tumorigenico della linea Hs 578T mediante il saggio d'invasione chemotattica. Le cellule sono state pre-trattate per diversi tempi antecedenti il saggio e per altre 48h durante il saggio stesso. Questo esperimento ci ha permesso di affermare che il K:D-Rib, alla concentrazione di 5 mM, interferisce con il potenziale chemioinvasivo della linea cellulare HTB-126 riducendolo circa dell'80% dopo una settimana di trattamento. Nel contempo si è messo a punto un metodo per misurare la concentrazione di potassio K^+ utilizzando il DNAzima come biosensore. Risultati preliminari indicano che il surnatante delle Hs 578T trattate con K:D-Rib 5mM per 48h mostra una concentrazione di DNAzima inferiore rispetto al DMEM (solo terreno di coltura delle cellule) incubato con K:D-Rib 5mM, ma superiore al solo DMEM (solo terreno) ed al

surnatante del controllo (Hs 578T non trattate), dimostrando che vi è un uptake cellulare dello ione K^+ e che il DNazima può essere utilizzato come biosensore per lo ione K^+ .

A completamento di questi esperimenti mediante Microscopia a Forza Atomica si è investigata la morfologia della linea cellulare Hs 578T ed in che modo questa potesse modificarsi in relazione al trattamento con K:D-Rib. Da un'attenta analisi si evince che nelle zone prossimali al nucleo delle cellule trattate, sono presenti riarrangiamenti della membrana cellulare ascrivibili a strutture simili a porosomi. Si può ipotizzare che i porosomi e le invaginazioni membranarie ed essi correlate siano il legame di tipo morfologico fra l'*uptake* di potassio e la modificazione di *hallmarks* tumorali quali la proliferazione e la chemoinvasione.

Si è quindi studiato l'effetto del K:D-Rib anche sulla proliferazione della linea di epitelio mammario non tumorale, Hs 578Bst, utilizzando il "n° di split". Il dato mostra un rallentamento non significativo del trattato e nessun cambiamento morfologico apprezzabile a seguito del trattamento. Non si sono riscontrati effetti neppure con il solo D-ribosio o il solo $KHCO_3$.

Infine avendo dimostrato il ruolo antiossidante del K:D-Rib si è deciso di studiare l'effetto protettivo del K:D-Rib contro i danni da radiazioni simulando in laboratorio due sedute di radioterapia. La dose somministrata è stata pari a 4 Gy, due somministrazioni da 2 Gy, in accordo con i protocolli terapeutici convenzionali, per il tumore mammario. Le misure AFM evidenziano evidenti danni alle strutture citoscheletriche connesse con la membrana ed alla membrana stessa, a seguito di un'esposizione pari a 4 Gy. Al contrario le cellule pre-trattate con K:D-Rib ed irraggiate presentano strutture simili al controllo con limitati effetti da radiazioni.

1 INTRODUZIONE

C'è qualcosa di vero nel vecchio adagio in cui si dice che il cancro è più antico del genere umano. I risultati paleopatologici indicano che negli animali i tumori esistevano già in epoca preistorica, molto prima che gli uomini apparvero sulla Terra. In medicina, la prima descrizione scritta di un cancro al seno si trova nel Papiro Edwin Smith, scritto circa nel 3000 aC (Hajdu, 2011). Il cancro è la principale causa di morte nei paesi economicamente sviluppati e la seconda causa di morte nei paesi in via di sviluppo confermando che l'incidenza dei tumori nei paesi economicamente in via di sviluppo è in aumento (Jemal et al., 2011). Questo nonostante le enormi somme impiegate ed il tempo trascorso nel ricercare la cura ideale, il tasso di mortalità per tumore nei soli Stati Uniti, per esempio, dal 1950 è sceso di appena dell'11% (2013).

Il cancro al seno è il tumore femminile più comune e la principale causa di morte per cancro nelle donne. Ogni anno ci sono circa trentamila nuovi casi e gli studi epidemiologici hanno registrato un aumento del 13.8% negli ultimi sei anni.

Il cancro al seno è una malattia molto eterogenea. I diversi aspetti tumorigenici, un disparato comportamento clinico la caratterizzano e le differenti alterazioni molecolari ne caratterizzano la crescita, la sopravvivenza e la risposta al trattamento.

Diversi sono i farmaci chemioterapici disponibili per il trattamento del cancro al seno. Sono in uso agenti alchilanti come ad esempio: cisplatino, carboplatino, ciclofosfamide. Questi farmaci interagiscono con il DNA formando addotti, crosslinks inter ed intra filamento ed altri riarrangiamenti strutturali che dovrebbero indurre l'attivazione di pathways apoptotici (Sathasivam, 2008; Siddik, 2003; Wheate et al., 2010).

Altri chemioterapici utilizzati nel trattamento del carcinoma mammario sono le antracicline: doxorubicina, idarubicina ed epirubicina. La maggior parte di questi farmaci, noti come intercalanti del DNA, interferiscono con la struttura nativa del DNA causando stress strutturali tali da portare alla rottura del doppio filamento, inibizione del ciclo cellulare con conseguente morte cellulare. Le antracicline sono note anche per inibire l'attività di topoisomerasi ed elicasi, enzimi che favoriscono svolgimento del DNA durante il processo di replicazione. Un altro aspetto delle antracicline è il forte potere ossidante che possono generare una volta incorporate (Charak and Mehrotra, 2013).

L'epirubicina ha un effetto simile alla doxorubicina come trattamento delle metastasi di cancro al seno, con tassi di risposta che vanno dal 25% al 62%, con meno cardiotossicità (Tryfonidis et al., 2013).

Altri farmaci sono gli alcaloidi vegetali quali paclitaxel, vinorelbina, vindesina. Gli alcaloidi della vinca si legano sia alla tubulina ed ai microtubuli, e le loro azioni sono altamente dipendenti dalla concentrazione del farmaco. Concentrazioni relativamente elevate, causano depolimerizzazione dei

microtubuli ed arresto delle cellule in mitosi. Concentrazioni millimolari inducono l'aggregazione di tubulina in strutture simili a cristalli. Al contrario, a basse concentrazioni, gli alcaloidi della vinca interferiscono con la dinamica dei microtubuli senza depolimerizzazione ma rimanendo in grado di arrestare la mitosi e indurre l'apoptosi (Zhou and Giannakakou, 2005).

Altri chemioterapici quali irinotecan, etoposide e teniposide sono gli inibitori delle topoisomerasi, enzimi indispensabili per il controllo della topologia del DNA. La doppia inibizione delle topoisomerasi I e II è in grado di produrre effetti citotossici arrestando sia la replicazione che la trascrizione del DNA, mantenendo la molecola in uno stato di tensione strutturale impedendone così la divisione cellulare (Chan and Coward, 2013; Kellner et al., 2000).

Nonostante i significativi progressi nella diagnosi precoce e costante progresso nel trattamento con farmaci sistemici, la maggior parte dei tumori al seno sviluppano resistenza ai farmaci (Munagala et al., 2011).

Il cardine del trattamento al tumore al seno è la chirurgia che, combinata alla radioterapia (RT) e trattamenti oncologici sistemici. Il trattamento radioterapico è una pratica clinica ormai assodata nel trattamento del tumore al seno (Eriksson et al., 2013). Dopo la chirurgia, la radioterapia all'incirca dimezza il rischio di recidiva in una vasta gamma di pazienti (Matthijs V. Nijenhuis 2013). Tramite un trattamento radioterapico ideale si dovrebbe somministrare una dose elevata di radiazioni al tumore, ed una dose minima al tessuto normale circostante. Per molti tumori esiste una chiara relazione tra dose di radiazione somministrata e la probabilità di controllo del tumore stesso, ma la dose al tumore è spesso limitata dalla tolleranza alla radiazione delle strutture circostanti (Taylor and Powell, 2004). In letteratura sono presenti articoli che attestano come la comparsa di recidive tumorali e tumori radioindotti siano causa di pregressi trattamenti radioterapici (Trine Grantzau a, 2013; Tubiana, 2009).

Piuttosto che vedere il cancro solamente in termini di mutazioni genetiche si stanno esaminando parametri peculiari della patologia tra cui: modalità di crescita cellulari, polarizzazione e depolarizzazione delle cellule cancerose e come alcune cellule evolvono e diffondono in tutto il corpo (2013). Nel 1970 Clarence Cone, biofisico al NASA's Langley Reseach Center in Virginia notò che le cellule tumorali erano meno polarizzate delle cellule non tumorali. Secondo Mina Bissel, biologa irano - americana per il tumore è estremamente importante il suo microambiente. Le modificazioni della matrice extracellulare determinano in misura molto fine se una cellula potrebbe diventare cancerosa oppure no (Cartlidge, 2013). Tecniche biofisiche hanno rivelato che le cellule tumorali coltivate sono più morbide e deformabili rispetto alle loro controparti sane (Cross et al., 2007; Plodinec et al., 2013).

Negli ultimi anni si è cercato di trovare tratti comuni alle diverse neoplasie ed particolare dall'anno 2000 questo aspetto si è concretizzato sempre più, potendo riunire così aspetti diversi ma

comuni a tutte le patologie tumorali. Sono state evidenziate sei caratteristiche distinte ma peculiari delle cellule cancerose chiamate *“hallmarks”*: **proliferazione cellulare**, elusione degli effetti oncosoppressori, **invasione e metastatizzazione**, angiogenesi, mancanza di eventi apoptotici ed immortalità (Figura 1). Queste caratteristiche sono comuni a tutti i tumori e le cellule normali progressivamente arrivano ad uno stato neoplastico, acquisendo una dopo l’altra queste caratteristiche fino alla conclamata malignità.

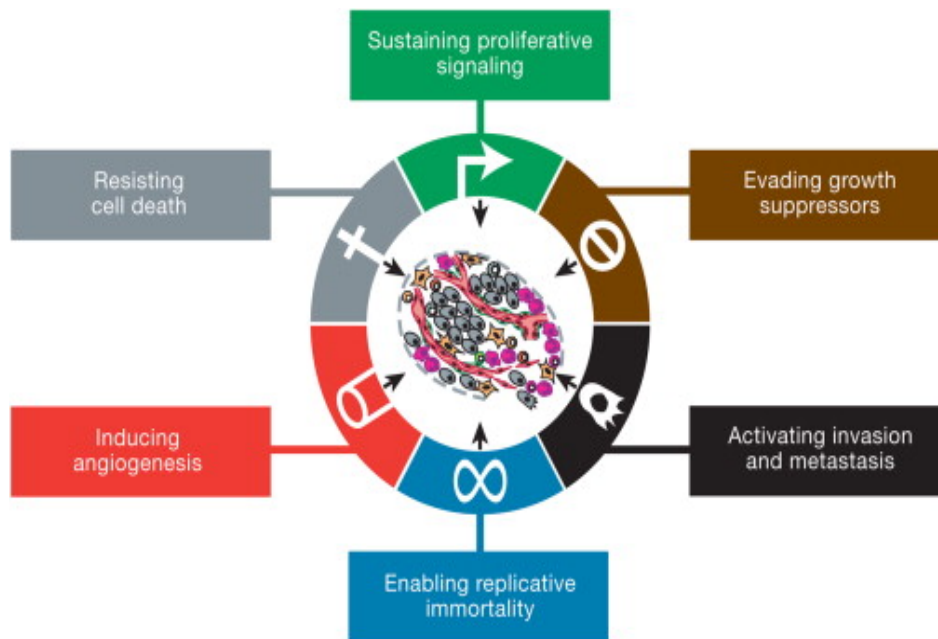


Figura 1: *“Hallmarks”* oncologici. Questa illustrazione comprende le sei caratteristiche peculiari originariamente proposte già dal 2000. L'ultimo decennio ha visto notevoli progressi verso la comprensione di ogni segno distintivo (Hanahan et al., 2011)

Le neoplasie possono essere considerate alla stregua di tessuti costituiti da più tipi cellulari distinti interagenti tra loro. Le cellule non tumorali reclutate, formando lo stroma associato al tumore, sono come partecipanti attivi nella tumorigenesi in quanto queste cellule contribuiscono allo sviluppo e l'espressione di certe funzionalità. La biologia dei tumori non può più essere intesa semplicemente elencando le caratteristiche delle cellule tumorali, ma invece deve comprendere i contributi del "microambiente tumorale" alla tumorigenesi stessa (Hanahan and Weinberg, 2011).

Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare come **la proliferazione cellulare** ed **il potenziale migratorio-invasivo**, considerati due *“hallmarks”* della linea cellulare tumorale (HTB-126) Hs578T, possano venire modificati dal K:D-Rib, soluzione acquosa di KHCO_3 e D-ribosio. Lo stesso composto è stato testato anche su un modello cellulare non tumorale (HTB-125) Hs578Bst. La linea HTB-126 deriva da un carcinosarcoma d'origine epiteliale. Dalla stessa paziente dalla

quale fu stabilizzata la linea cellulare tumorale, fu stabilizzata anche la linea cellulare non tumorale HTB-125. Quest'ultima d'origine mioepiteliale, costituiva il tessuto periferico al tumore (Hackett AJ, 1977). Il K:D-Rib può essere concepito come un integratore alimentare e data la sua natura è stato da subito chiaro che lo scopo di questo studio fosse una valutazione comparata degli effetti su un modello tumorale ed un non tumorale. Essendo le due linee cellulari diverse, si sono potuti utilizzare approcci metodologici diversi.

Circa la linea cellulare tumorale HTB-126 si è valutato l'effetto del K:D-Rib sulla proliferazione cellulare. Mantenendo le cellule in trattamento a lungo si può valutare la presenza o meno di fenomeni adattativi al K:D-Rib. Da questa prima analisi si è passato ad un trattamento per una durata inferiore ottenendo le curve di crescita sia per il controllo che per il trattato. Dalle curve si è calcolato il tempo di duplicazione (DP time).

Un altro aspetto importante della proliferazione cellulare è la capacità clonogenica valutata per la linea HTB-126 attraverso il saggio delle colonie o *clonogenic assay* (Franken et al., 2006). Si sono potute confrontare le colonie originate dalle cellule di controllo con quelle originate dalle cellule trattate con K:D-Rib.

La tumorigenicità o malignità di una linea cellulare tumorale può essere studiata *in vitro* mediante il saggio di chemoinvasione (Wiggins and Rappoport, 2010). Questo permette la valutazione dell'influenza del trattamento con K:D-Rib sia sulla migrazione che sul potenziale invasivo della linea HTB-126.

Dalla valutazione degli effetti del K:D-Rib si è passati ad indagare il meccanismo d'azione. Il primo passo è stato verificare se il composto e nello specifico il potassio entrasse all'interno della cellula.

Il potassio è uno degli elementi cardini per la vita della cellula. È responsabile del mantenimento e della genesi del potenziale d'azione, è un regolatore dell'apoptosi e coordina ed orchestra il folding dei G-quadruplex (Crocchi et al., 2011). Come biosensore di potassio si è utilizzato il DNAzima, molecola costituita da G-quadruplex (apoenzima) ed emina (porzione catalitica) e presenta attività perossidasi (Travascio et al., 1998). Il G-quadruplex se foldato in presenza di ioni potassio manifesta un'affinità molto alta per l'emina e questa topologia determina la formazione del DNAzima, rilevabile attraverso spettroscopia UV-VIS, essendo una molecola otticamente attiva. Al momento si sta cercando di utilizzare i soli G-quadruplex come biosensori di potassio, sfruttando i cambiamenti conformazionali del folding in presenza di diverse concentrazioni di potassio. Queste conformazioni possono essere studiate analizzando il folding tramite spettroscopia CD. Il G-quadruplex sembra essere un sistema altrettanto informativo ma più semplice rispetto al DNAzima, in quanto non è presente l'emina.

Informazioni circa l'effetto del K:D-Rib ed il suo meccanismo d'azione sulla linea cellulare di carcinoma mammario umano, sono state ottenute anche grazie all'analisi morfologica della linea

cellulare tumorale HTB-126 mediante microscopia a forza atomica (AFM). L'analisi è stata focalizzata su particolari distretti cellulari come ad esempio le regioni perinucleari e le regioni di connessione della cellula al substrato.

L'effetto del K:D-Rib sulla linea cellulare d'epitelio mammario umano non tumorale HTB-125 è stato indagato con lo stesso approccio. Si è investigato l'effetto del K:D-Rib sulla proliferazione cellulare. Non avendo le caratteristiche tipiche delle cellule tumorali, non si è studiata la capacità clonogenica, il potenziale migratorio e quello invasivo.

In fine a seguito di risultati che hanno dimostrato l'azione antiossidante del K:D-Rib (Crocì et al., 2011) si è voluto verificare un eventuale effetto protettivo contro i danni da radiazioni ionizzanti, studiando la morfologia cellulare mediante AFM. Per far ciò si è simulato un trattamento di radioterapia in cui la linea cellulare HTB-125 trattata con K:D-Rib è stata irraggiata con raggi X.

2 STATO DELL'ARTE

2.1 DEFINIRE IL CANCRO

Sul sito [dell'american Cancer Society](#) alla domanda "What is cancer?" si legge la seguente risposta "*Cancer is the general name for a group of more than 100 diseases. Although there are many kinds of cancer, all cancers start because abnormal cells grow out of control. Untreated cancers can cause serious illness and death*".

Dal sito [dell'agenzia italiana per la ricerca sul cancro AIRC](#) alla parola cancro si trova la seguente definizione "non si può parlare di un'unica malattia chiamata cancro, ma di diversi tipi di malattie, che hanno cause diverse e distinte, che colpiscono organi e tessuti differenti, che richiedono quindi esami diagnostici e soluzioni terapeutiche particolari. Esistono però alcune proprietà che accomunano tutti i tumori, e che consentono di tentare una risposta valida un po' per tutte le forme della malattia. Per usare una metafora, si può dire che ad un certo punto, una cellula dell'organismo "impazzisce" - perde alcune sue proprietà, ne acquisisce altre - e comincia a moltiplicarsi al di fuori di ogni regola".

Entrambe le definizioni collimano sulla multifattorialità della patologia e sul fatto che cellule di un organismo sano, possono "impazzire" ed iniziare una vita biologica assolutamente al di fuori e non curanti delle "regole" imposte e dettate dal tessuto nel quale si trovano. Questa visione un po' letterale del tumore, ha però comprovati fondamenti scientifici.

Storicamente il cancro si potrebbe pensare esser una patologia legata al progresso ed allo sviluppo, ma la sua nascita precede di molto l'inizio dell'era scientifico-tecnologica. Solo l'incidenza della malattia è aumentata negli ultimi anni, ma la patologia è comparsa molto tempo prima. Sono arrivati fino a noi reperti fossili che mostrano come neoplasie fossero già presenti in arti di animali preistorici [1].

Il cancro, come si evince dalle due definizioni, è definito come una malattia multifattoriale. Diversi sono gli aspetti coinvolti e soprattutto diversi sono i fattori di rischio che possono favorire l'insorgere della malattia. Ci sono evidenti correlazioni fra l'obesità, il diabete di tipo due e lo sviluppo di carcinomi. Lo stile di vita come la scarsa attività fisica ed uno stile alimentare sregolato, aumentano i fattori di rischio. Fattori biologici quali l'obesità addominale, stati infiammatori, dislipidemia, iperglicemia ed alterati livelli di adipochine, possono favorire l'insorgenza di tumori. Studi *in vitro* ed *in vivo*, hanno mostrato il contributo potenziale di questi fattori circa lo sviluppo di tumori [2].

Sebbene numerosi studi epidemiologici hanno indagato i fattori di rischio oncologico, molto meno studiati sono stati gli aspetti demografici, lo stile di vita, la componente ereditaria, i fattori clinici e

sociali. Altrettanto poco studiate sono state le interazioni tra questi fattori che possono influenzare i risultati relativi alle neoplasie in termini diagnostici e prognostici. In letteratura gli studi circa la sopravvivenza al cancro, con riferimento alla qualità della vita, sono state le aree di ricerca più investigate con il 62% di studi. Negli ultimi anni, tuttavia, vi è stato un aumento di sforzi concentrati sui fattori molecolari, genetici, e predittivi che influenzano le recidive neoplastiche [3].

L'organizzazione Mondiale della Sanità OMS ha sviluppato tre principi circa la prevenzione del cancro:

1. le correnti strategie di prevenzione potrebbero interessare fino ad un terzo dei nuovi casi di tumore
2. il miglioramento degli screening diagnostici di neoplasie in fasi precoci dello sviluppo tumorale potrebbero portare a scoprire un terzo dei tumori con un guadagno nella sopravvivenza del paziente
3. una strategia globale di trattamento potrebbe migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita per un altro terzo dei pazienti con tumore ad uno stadio avanzato [4].

2.1.1 Approcci di studio e terapie tradizionali

Il cancro è ancora una delle maggiori cause di morte nonostante anni di studi e fondi impiegati per risolvere il problema, volti alla ricerca d'approcci terapeutici idonei alla complessità della malattia. I biologi hanno trascorso decenni a caccia di una "cura" inafferrabile per il cancro, tutto basato sul presupposto che i geni sono al centro della malattia. Analizzare e studiare queste mutazioni, dovrebbe portare al disegno di potenti terapie che possano "correggere" queste mutazioni assolvendo così al meccanismo biologico mutato. Ma nonostante le somme enormi impiegate ed il tempo trascorso nel ricercare la cura ideale contro il cancro, il tasso di mortalità per tumore nei soli Stati Uniti dal 1950 è sceso appena dell'11% [5].

L'introduzione di terapie mirate per i meccanismi delle patologie tumorali è uno dei frutti di tre decenni di notevoli progressi della ricerca sui meccanismi di patogenesi del cancro [6]. Progressi senza precedenti nella capacità di sequenziamento dei genomi, misurare l'espressione di geni codificanti e non codificanti per RNA, l'analisi epigenetica, ed i profili di proteomica e metabolomica su larga scala stanno avendo un grande potere sulla direzione della ricerca e sulla visione di come i malati di cancro dovrebbero essere trattati. Lo scopo di queste tecnologie sarebbe dare la possibilità di un'analisi personalizzata dei tumori per contribuire a definire ed identificare biomarcatori. Questi che potrebbero permettere una terapia basata sulla comprensione delle vie che operano in ogni singola neoplasia, piuttosto che trattare tutti i tumori allo stesso modo [4].

La crescente comprensione di gran parte dei meccanismi molecolari responsabili delle trasformazioni neoplastiche e della progressione ha spinto la ricerca di nuovi farmaci che

potrebbero interferire con i bersagli intracellulari coinvolti in questo processo. Farmaci che hanno come targets specifici molecole, ad esempio il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), vengono utilizzati sempre più per trattare il cancro. In questo momento, i medici stanno combinando radioterapia e trattamenti farmacologici, come inibitori di checkpoint e molecole bersagli della trasduzione del segnale e del microambiente tumorale. Inoltre, si sta esplorando la possibilità di combattere patogeni, quali il virus di Epstein-Barr e le oncoproteine virali codificate dall'ospite per il virus stesso, per migliorare l'efficacia della radioterapia nei pazienti. Grazie al rapido sviluppo di metodi d'imaging molecolare diretti verso recettori, enzimi, apoptosi, angiogenesi e vascolarizzazione tumorale, la diagnostica per immagini sta diventando un potente strumento per comprendere lo sviluppo e progressione del cancro. Il miglioramento delle tecniche d'imaging è d'aiuto sia nello sviluppo di farmaci antitumorali che nella valutazione degli effetti terapeutici nei pazienti [4].

Un'attenzione sul rapporto tra infezione e cancro, al fine di designare sempre più importanti strategie terapeutiche. Circa 200.000 donne muoiono ogni anno da carcinoma della cervice, che è strettamente associato con papillomavirus umano (HPV). L'infezione da *Helicobacter pylori* invece è collegata a gastromicosi, che è la fase precancerosa del carcinoma gastrico di tipo tre.

Studi eseguiti per affrontare i meccanismi molecolari di carcinogenesi, combinando i dati epidemiologici ed i risultati *in vitro*, hanno portato ad un improtante aumento del bagaglio conoscitivo relativo al cancro. Ad esempio lo studio dei cambiamenti epigenetici durante la carcinogenesi sta rapidamente diventando un importante campo di studio. Il silenziamento epigenetico mediante la metilazione dell'isola CpG (CIMP), incarna una nuova prospettiva nella diagnosi e nella terapia del cancro. L'interazione dinamica tra le modificazioni epigenetiche e posttraduzionali tra cui fosforilazione, acetilazione ed ubiquitinazione, concorrono alla complessa regolazione della carcinogenesi. RNA non codificanti, come micro RNA, sono coinvolti nella carcinogenesi [7-9]. Il ruolo della medicina traslazionale è molto importante e riguarda il passaggio dal concetto alla pratica visto anche come il passaggio dal bancone del laboratorio al letto del paziente. La medicina traslazionale ha permesso d'acquisire sempre più conoscenze circa i tre più comuni problemi del cancro: la diagnosi, la terapia e guarigione [4].

Come riportato in figura 2.1 sembrerebbe che se un farmaco è mirato verso un particolare processo, allora la sua inibizione dovrebbe compromettere la crescita e la progressione tumorale. Com'è evidente dalla figura 2.1 il disegno delle terapie convenzionali sembrerebbe diretto verso un particolare target metabolico – molecolare che permetterebbe al tumore di acquisire una specifica caratteristica, chiamata anche “hallmarks”.

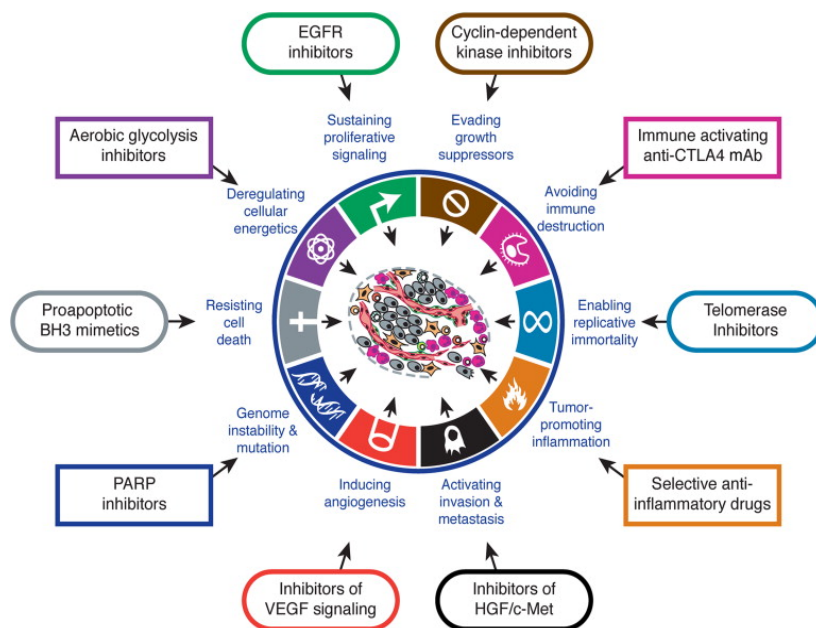


Figura 2.1: Farmaci che interferiscono con “hallmarks” delle funzionalità acquisite necessarie per la crescita e la progressione tumorale. Questi farmaci sono stati sviluppati e sono stati approvati in studi clinici per il trattamento di alcune forme di cancro.

In accordo con questa logica, il farmaco dovrebbe bloccare la formazione e/o la progressione tumorale. Tale specificità d’azione è stata considerata una virtù, in quanto presentava attività inibitoria contro un obiettivo pur avendo, in linea di principio, relativamente meno effetti collaterali e quindi meno tossicità aspecifica. Nonostante quest’elegante e logica assunzione i successi clinici sono generalmente temporanei e seguiti da recidive quasi inevitabili.

Un’interpretazione, sostenuta da un crescente numero di dati sperimentali, è che ciascuno degli “Hallmarks” neoplastici è regolato da vie di segnalazione parzialmente ridondanti. Di conseguenza, un agente terapeutico mirato inibendo una via chiave in un tumore non può completamente spegnere un “Hallmarks”, permettendo così ad alcune cellule tumorali di sopravvivere con la possibilità che la loro progenie possa eventualmente adattarsi alla pressione selettiva imposta dalla terapia. Tale adeguamento può essere realizzato da: una mutazione, una riprogrammazione epigenetica o un rimodellamento del microambiente stromale. Questo sarà in grado di ristabilire la capacità funzionale, permettendo una crescita tumorale rinnovata. Siccome il numero di vie di segnalazione parallele supportanti un “hallmarks” deve essere limitato, potrebbe diventare possibile indirizzare una terapia verso tutti questi percorsi, impedendo così l’adattamento della patologia alla terapia.

In risposta al trattamento le cellule tumorali possono silenziare un “*hallmarks*” mostrandone però altri, il che rappresenta un esempio di farmacoresistenza acquisita in seguito al trattamento farmacologico. Questo concetto è esemplificato dalle recenti scoperte relative alle risposte di alcuni tumori a terapie antiangiogenetiche. Alcuni studi prevedevano che l'inibizione efficace dell'angiogenesi renderebbe i tumori dormienti e potrebbe portare anche alla loro progressiva distruzione [10]. Nonostante questo le risposte cliniche alle terapie antiangiogenetiche sono state trovate esser transitorie. In alcuni modelli preclinici, dove neoplasie erano trattate con potenti inibitori dell'angiogenesi, vi era un'interferenza con l'attività angiogenica ma negli stessi modelli invasività e metastatizzazione erano significativamente aumentate [11-13]. Invadendo i tessuti vicini, le cellule tumorali inizialmente non sono in grado di costruire una rete vascolare ma accedono al preesistente sistema vascolare. Questo è stato visto in glioblastomi trattati con farmaci antiangiogenetici [14-16].

Ad esempio farmaci pro apoptotici possono indurre nelle cellule tumorali un aumento dei segnali mitogeni, consentendo così di compensare l'effetto iniziale innescato da tali trattamenti. Queste considerazioni suggeriscono che lo sviluppo di farmaci e la progettazione di protocolli terapeutici dovranno esser integrati con le informazioni relative ai pathways che supportano questi processi [6].

2.1.2 Approcci di studio non genetici al problema cancro

Piuttosto che vedere il cancro solamente in termini di mutazioni genetiche, alcuni fisici stanno esaminando parametri peculiari della patologia tra cui: modalità di crescita cellulari, polarizzazione e depolarizzazione delle cellule cancerose e come alcune cellule evolvono e diffondono in tutto il corpo [5].

Nel 1970 Clarence Cone, biofisico al NASA's Langley Research Center in Virginia notò che le cellule tumorali erano meno polarizzate di quelle non tumorali. Cone suggerì che la polarizzazione delle cellule poteva portare ad una regolazione della proliferazione cellulare.

40 anni dopo Michel Levin e Brook Chernet modificando geneticamente dei girini mediante mRNA oncogenici, confermarono le assunzioni di Cone. Immergendo le larve in coloranti fluorescenti sensibili al voltaggio, valutarono la differenza di polarizzazione delle cellule costituenti le larve. Levin e Chernet non sapevano quali girini avessero sviluppato tumori. Non appena un girino esibì una macchia scura indicando un abbassamento della polarizzazione delle cellule, i ricercatori isolarono queste larve dalle altre per monitorarle. Essi scoprirono che le macchie scure indice di una depolarizzazione, erano quasi sempre presenti in regioni tumorali confermando così il legame tra la polarizzazione delle cellule e cancro [17].

Secondo Mina Bissel, Biologa irano - americana per il tumore è estremamente importante il suo microambiente. Le modificazioni della matrice extracellulare determinano in misura molto fine se una cellula potrebbe diventare cancerosa oppure no [18].

Tramite analisi di microscopia a forza atomica (AFM) si sta investigando il perchè le cellule tumorali sono strutturalmente più morbide rispetto alle cellule non tumorali, nonostante le masse cancerose siano piuttosto dure. Questo aspetto apparentemente paradossale, potrebbe assumere anche valore di tipo prognostico-predittivo su quale potrebbe essere l'evoluzione delle cellule tumorali [5, 19].

Tecniche biofisiche rivelano che le cellule tumorali coltivate sono più deformabili rispetto alle loro controparti non tumorali. Quest'aumento d'elasticità e/o deformabilità è accompagnato da alterazioni nella struttura citoscheletrica ormai note esser associate ad un aumento della malignità [20, 21].

Altri ricercatori sono impegnati nell'analizzare se la proliferazione delle cellule tumorali può essere impedita manipolando la loro polarizzazione. Un altro aspetto emerso tramite microscopia confocale, è la rotazione delle cellule di tumore mammario. Secondo alcuni scienziati quest'aspetto potrebbe contenere indizi di tipo prognostico relativi alla patologia tumorale [5].

2.1.3 ricerca di hallmarks

Con il termine “*hallmarks*” s’intendono quelle caratteristiche acquisite dalle cellule durante la trasformazione neoplastica. Gli “*hallmarks*” sono importanti perché ci forniscono parametri per comprendere la formazione e la progressione tumorale come riportato da *Hanahan et al.*, (Hanahan and Weinberg, 2011). Gli “*hallmarks*” fino al 2000 erano sei: **segnali di attiva proliferazione cellulare, elusione dei segnali di soppressione tumorale, resistenza alla morte cellulare, immortalità cellulare, induzione di angiogenesi** ed infine **malignità** (invasione e metastasi) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dal 2000 in poi c’è stato il tentativo da parte di più scienziati di individuarne di altri, pertanto attualmente l’analisi e la classificazione è diventata via via più complessa. Ne sono stati proposti altri che includono l’elusione del controllo del sistema immunitario (Hanahan and Weinberg, 2011; Negrini et al., 2010) ed altre cinque caratteristiche relative alla presenza di stress nel cancro: il danno al DNA e la replicazione del DNA, lo stress ossidativo, lo stress mitotico, lo stress proteotossico (accumulo di proteine non correttamente foldate) e lo stress metabolico (Luo et al., 2009; Negrini et al., 2010). Questi nuovi *hallmarks* sono qualitativamente differenti rispetto ai primi in quanto non descrivono le capacità funzionali di tumori ma piuttosto lo stato delle cellule tumorali, caratterizzato dalla presenza dei vari stress.

In accordo con l’analisi di Hanhan accanto ai primi sei *hallmarks* se ne possono collocare altre quattro quali: **i cambiamenti metabolici nel tumore, l’elusione da parte della patologia della sorveglianza del sistema immunitario, l’instabilità genomica e l’infiammazione promotrice del tumore** 2.1.

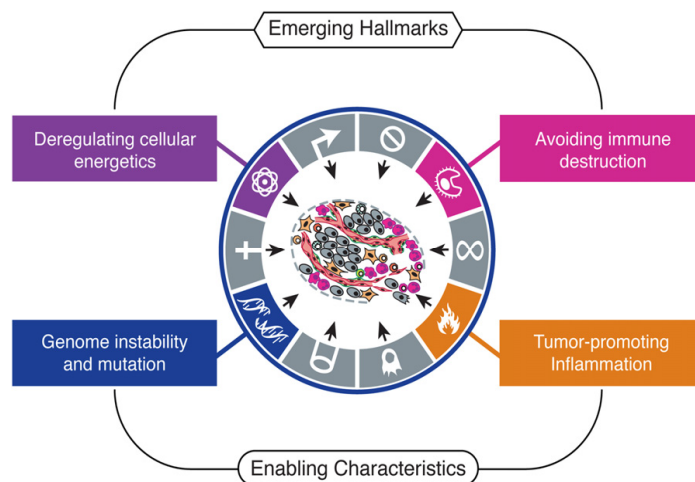


Figura 2.1: Hallmarks Emergenti Un numero crescente di ricerche suggerisce il coinvolgimento di due caratteristiche addizionali o nuovi “hallmarks” neoplastici, nella patogenesi tumorale. Il primo riguarda la possibilità di modificare o riprogrammare il metabolismo cellulare al fine di sostenere la proliferazione neoplastica. Il secondo permette alle cellule tumorali di eludere il controllo del sistema immunitario, in particolare dai linfociti T e B, macrofagi e cellule natural killer. Altre due caratteristiche facilitano l’acquisizione delle due descritte in precedenza: l’instabilità genomica e l’infiammazione connessa alla neoplasia. L’instabilità genomica connessa con la possibilità che le cellule tumorali hanno di mutare, possono esser indispensabili per il tumore.

2.1.3.1 Attiva proliferazione tumorale.

Nei tessuti non tumorali vi è un rilascio controllato di fattori di crescita che promuovono e coordinano, attraverso la proliferazione cellulare e l'apoptosi, l'architettura e l'omeostasi tissutale. Le cellule cancerose non hanno questi meccanismi così controllati e finemente regolati, perciò diventando loro stesse "i maestri del loro destino biologico" (Hanahan and Weinberg, 2011). L'acquisizione di una funzione, in questo caso una maggior capacità proliferativa, è legata al concetto di oncogene. Un oncogene è un gene con una mutazione che garantisce un'acquisizione di funzione e come tale si manifesta. Le cellule tumorali possono acquisire un'intensa capacità proliferativa in diversi modi: producendo loro stesse fattori di crescita oppure tramite l'espressione di recettori per fattori di crescita; stimolazione proliferativa autocrina. Oppure le cellule tumorali possono inviare segnali alle cellule non tumorali, costituenti lo stroma associato al tumore, che a loro volta inviano fattori di crescita alle cellule tumorali. Un'elevata espressione di recettori per fattori di crescita può portare ad un'elevata proliferazione cellulare, nonostante la sintesi di fattori di crescita sia fisiologica.

Lo stesso effetto lo si può avere nel caso in cui sia l'espressione dei recettori che la sintesi di ligando sia fisiologica, ma quest'ultimo è mutato. In questo caso il ligando non riuscendo a staccarsi dal recettore secondo tempi fisiologici, porta la cellula ad una proliferazione continua.

La proliferazione cronica delle cellule tumorali potrebbe arrivare anche a valle dell'interazione ligando – recettore. Ad esempio se abbiamo un trasduttore del segnale mutato come RAS, abbiamo un'attivazione costitutiva della proliferazione cellulare senza necessariamente avere mutazioni a monte. Recenti studi hanno evidenziato l'importanza di feedback negativi, ovvero controlli che normalmente operano nel silenziare i vari tipi di segnale ed assicurare in tal modo l'omeostasi della proliferazione .

Il prototipo di questa regolazione è Ras. Se RAS presenta una mutazione funzionale relativa all'attività GTPasica, non può più comportarsi come un regolatore negativo per la via di trasduzione del segnale. Isoforme mutate nella subunità catalitica della PI3-chinasi sono state trovate in una vasta gamma di tumori. Queste mantengono sempre attivo il pathway di segnalazione della PI3-chinasi. Un altro regolatore negativo coinvolge la fosfatasi PTEN che degrada PIP3 (fosfatidil inositolo trifosfato), prodotto della PI3 chinasi. La mutazione per perdita di funzione di PTEN amplifica il signaling di PIK3 promuovendo la tumorigenesi in molti modelli di studio neoplastici. Nei tumori umani è stato trovato il promotore di PTEN metilato e la sua espressione è downregolata.

Il 40% dei melanomi umani contengono mutazioni in B-Raf, con conseguente segnalazione costitutiva, attraverso Raf, della *mitogen activated protein* (MAP) - chinasi (Hanahan and Weinberg, 2011).

Una collocazione in questo paragrafo la trovano anche i canali potassio come dimostrano gli studi condotti da De Coursey e collaboratori nel 1984 su linfociti e da Day nel 1993 su embrioni.

Una panoramica del ruolo generale esercitata dai canali K^+ sulla progressione del ciclo cellulare è fornita da Ouadid-Ahidouch e Ahidouch nel 2013. Mentre lo studio dei canali voltaggio-dipendenti Kv1.3 e KV1.5 nel cancro umano è riesaminata da Arriva e collaboratori in un lavoro del 2013. Un gruppo di canali K^+ voltaggio-dipendenti sembrano esser coinvolti nella cancerogenesi e comprendono KV10 o Eag ed il KV11 o Erg. È stato dimostrato che l'espressione di superficie del canale KV10.1 oncogeno è regolata dalla proteina Golgi residente PIST (noto anche come GOPC), da una interazione mediata dal dominio PDZ (Becchetti et al., 2013). Da questo momento in poi una grande varietà di canali K^+ sono stati trovati essere implicati nella regolazione della proliferazione di carcinoma prostatico, del colon, del collo e tumore della testa, linfoma e cellule di epatocarcinoma. Questi dati si basano sul fatto che, *in vitro*, inibizione genetica o farmacologica di canali K^+ blocca la crescita di cellule tumorali. Anche l'apertura del canale K^+ può essere responsabile di un aumento del tasso di proliferazione cellulare. Uno dei modelli più accreditati si basa sul coinvolgimento dei canali K^+ nella regolazione del potenziale di membrana, che spinge le cellule tumorali in alcune fasi del ciclo cellulare. È stato dimostrato che le cellule nella fase G1 precoce sono depolarizzate, ma sono iperpolarizzate durante la progressione del ciclo attraverso la fase G1 e nella fase S. L'inibizione dei canali K^+ o il blocco delle cellule in fase G1 per deplezione da siero è accompagnato da depolarizzazione della membrana. Analogamente la depolarizzazione della membrana causata da un aumento della concentrazione di K^+ extracellulare mima gli effetti dei bloccanti dei canali K^+ . I meccanismi che consentono ai canali K^+ di regolare la crescita cellulare in linee cellulari tumorali sembrano essere diversi da quelli in cellule normali. È stato riportato che le cellule tumorali esprimono diverse isoforme dei canali K^+ che possono essere fisiologicamente differenti rispetto ad un canale *wild type* (Ouadid-Ahidouch and Ahidouch, 2013). Un legame fra ione potassio e proliferazione cellulare è fornito dai G-quadruplex. Questi sono strutture terziarie di sequenze di acidi nucleici ricche in guanina. Tali strutture sono generate attraverso legami idrogeno (appaiamento di *Hoogstein*) tra quattro guanine, che formano la cosiddetta tetrade. Queste sono stabilizzate attraverso la presenza di un catione monovalente che si dispone al centro della tetrade stessa. Diversi sono i cationi che possono intervenire nel folding di queste strutture, ma lo ione che presenta affinità maggiore è lo ione potassio (Parkinson et al., 2002; Xu et al., 2006).

Il link fra i G-quadruplex e la proliferazione cellulare emerge analizzando parte delle sequenze promotrici di alcuni oncogeni. Infatti sequenze di DNA ricche in guanine si trovano in regioni promotrici di una serie di regolatori trascrizionale (Dai et al., 2006). La stabilizzazione ed il folding dei G-quadruplex può ostacolare direttamente la progressione del ciclo cellulare: il DNA deve essere srotolato per la progressione della fase S ed anche per tante altre funzioni. Di conseguenza la stabilizzazione potrebbe metter in stallo la cellula tumorale e fermare la progressione della fase S. Diversi ligandi di G-quadruplex hanno dimostrato diminuire l'espressione di alcuni oncogeni. In teoria, l'espressione degli oncogeni associati a tutti e sei gli *hallmarks* possono essere bloccate promuovendo il folding dei G-quadruplex delle sequenze ricche in guanina presenti nelle sequenze promotrici (Hampel et al., 2013).

2.1.3.2 elusione dei segnali di soppressione della crescita tumorale

Le cellule tumorali mostrano abilità nell'eludere l'azione delle proteine codificate dai geni soppressori del tumore, o geni che regolano negativamente la proliferazione cellulare. Moltissimi oncosoppressori sono stati trovati mutati nella stragrande maggioranza dei tumori. I paradigmi degli oncosoppressori tumorali sono TP53 ed RB *associated protein*. Le attività di queste due proteine sono direttamente connesse con l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione di eventi apoptotici. TP53 ed RB *associated protein* rivestono ruoli chiave nella regolazione del ciclo cellulare.

RB *associated protein* coordina il signaling cellulare che parte dall'ambiente extracellulare. Cellule deficitarie di RB *associated protein*, mancano di un regolatore chiave del ciclo cellulare e questo potrebbe portare ad una proliferazione incontrollata. TP53, a differenza di RB *associated protein*, riceve segnali dall'ambiente intracellulare. Gli *input* derivano da situazioni di stress quali: mutazioni geniche o genomiche, stress nutrizionali, stress relativi alla scarsità di ossigeno o carenza di fattori di crescita. TP53 può bloccare il ciclo cellulare fino a quando le condizioni non sono ritornate compatibili con la progressione del ciclo cellulare. TP53 potrebbe promuovere eventi apoptotici nel caso in cui la cellula o non ripara i danni oppure le condizioni sfavorevoli permangono. TP53 e RB *associated protein* hanno un'importanza primaria nella regolazione della proliferazione cellulare ma entrambe sono parte integrante di una più ampia rete di *signaling* cellulare.

2.1.3.3 Resistenza alla morte cellulare.

È ormai noto da almeno vent'anni che l'apoptosi è un *pathway* chiave contro la proliferazione delle cellule tumorali. Gli stimoli che inducono l'apoptosi sono molteplici: fattori oncogenetici, danni

cellulari, severe mutazioni geniche e genomiche. In alcuni casi la resistenza ad agenti antineoplastici è connessa con il mancato innesco di pathways apoptotici.

Le cellule tumorali evolvono una serie di strategie per limitare o eludere l'innesco di eventi apoptotici; la più comune è la perdita di TP53. Altri *pathways* che possono eludere gli eventi apoptotici sono: aumento dell'espressione di regolatori antiapoptotici (Bcl-2, Bcl-xL) o di segnali di sopravvivenza (Igf1/2) oppure down regolazione di fattori proapoptotici (Bax, Bim, Puma). La molteplicità dei meccanismi elusivi dell'apoptosi riflette presumibilmente la diversità dei segnali che inducono l'apoptosi.

L'apoptosi può esser innescata attraverso due *pathways* uno estrinseco ed uno intrinseco. Il primo si attiva quando gli stimoli derivano dall'esterno della cellula (FAS ligando-recettore) mentre il secondo, integra e coordina i segnali che derivano dall'ambiente intracellulare. Entrambi i pathways culminano con l'attivazione rispettivamente delle caspasi 8 e 9. Da qui inizia la cascata proteolitica, promossa dall'attivazione delle caspasi, che comporta un progressivo disassemblamento delle cellule, formazione dei corpi apoptotici e morte.

Bcl-2 con Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 ed A1 sono inibitori dell'apoptosi legandosi e bloccando le due proteine proapoptotiche Bax e Bak, che si trovano nella membrana mitocondriale esterna. Se attivate perturbano l'integrità della membrana mitocondriale esterna causando così il rilascio di proteine di segnalazione proapoptotiche, la più importante delle quali è il citocromo *c*. Il citocromo *c* rilasciato attiva una cascata di caspasi inducendo i molteplici cambiamenti cellulari previsti dall'apoptosi.

2.1.3.4 Immortalità cellulare

L'illimitato potenziale replicativo contraddistingue le cellule tumorali rispetto alle cellule non tumorali, nelle quali è associata alla senescenza cellulare. La senescenza è uno stato non proliferativo tipicamente irreversibile che culmina con la morte cellulare.

La senescenza cellulare è connessa con la lunghezza dei telomeri, ripetizioni esanucleotidiche in tandem, che si accorcia progressivamente ad ogni ciclo cellulare fino a perdere la capacità di proteggere l'estremità del DNA da fusioni con le estremità degli altri cromosomi.

L'espressione della telomerasi è quasi assente nelle cellule non immortalizzate o nelle cellule non tumorali, ma espressa nella stragrande maggioranza (circa 90%) delle cellule immortalizzate, comprese le cellule tumorali umane. Allungando il DNA telomerico la telomerasi è in grado di contrastare il progressivo accorciamento dei telomeri che si verifica in sua assenza. Questo può esser raggiunto meno frequentemente, tramite un meccanismo alternativo di mantenimento dei telomeri basato sulla ricombinazione.

È stato visto che le sequenze telomeriche, essendo sequenze ricche in guanine possono foldarsi in strutture chiamate G-quadruplex, ampiamente trattate più avanti. La lunghezza del DNA telomerico detta quante duplicazioni cellulari si possono avere, prima che la lunghezza dei telomeri sia tale da far entrare la cellula in senescenza. L'accorciamento dei telomeri è visto come un orologio che mantiene il potenziale replicativo limitato nelle cellule normali ma eluso dalle cellule tumorali.

Il folding del DNA telomerico in G-quadruplex ha dimostrato inibire l'attività della telomerasi, DNA polimerasi RNA dipendente che sintetizza il DNA telomerico solo se una porzione del filamento stampo è accessibile all'enzima (Brooks et al., 2010). L'inattivazione della telomerasi potrebbe essere un inibitore specifico del cancro, in quanto attivata nel 80-90% dei tumori. Un altro aspetto molto importante potrebbe essere la stabilizzazione dei G-quadruplex, in modo da rendere il DNA inaccessibile alla telomerasi e bloccare il suo allungamento.

2.1.3.5 Angiogenesi

Come i tessuti normali anche i tumori richiedono nutrienti ed ossigeno, nonché la possibilità di eliminare metaboliti ed anidride carbonica. La formazione di un sistema vascolare è chiamato angiogenesi, processo tanto importante quanto complesso. Durante l'embriogenesi, lo sviluppo del sistema vascolare comporta la nascita di nuove cellule endoteliali ed il loro assemblaggio in capillari (vasculogenesi) in aggiunta alla produzione (angiogenesi) di nuovi vasi da quelli esistenti. Nell'adulto e nella maggior parte dei processi fisiologici, l'angiogenesi è attiva ma solo transitoriamente mentre nelle neoplasie l'"interruttore angiogenico" è quasi sempre attivo.

La neovascolarizzazione tumorale è segnata da una precoce genesi capillare, una contorta ed eccessiva ramificazione dei vasi, vasi distorti e dilatati, flusso di sangue irregolare, micro emorragie e livelli non fisiologici di proliferazione delle cellule endoteliali ed assenza d'eventi apoptotici.

L'angiogenesi è regolata da fattori che o l'inducono o la deregolano (Baeriswyl e Christofori, 2009; Bergers e Benjamin, 2003). Alcuni di questi regolatori angiogenici sono proteine di segnalazione che si legano a recettori delle cellule endoteliali stimolandoli o inibendoli. Ben noti induttori ed inibitori di angiogenesi sono rispettivamente fattore di crescita endoteliale vascolare - A (VEGF-A) e trombospondina-1 (TSP-1).

Il gene VEGF-A codifica per ligandi coinvolti nel coordinare la crescita di nuovi vasi sanguigni durante lo sviluppo embrionale e post natale, nell'omeostasi e nella sopravvivenza delle cellule endoteliali durante situazioni patologiche e fisiologiche nell'adulto. È stato dimostrato che membri appartenenti famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), sono implicati nel sostenere l'angiogenesi tumorale, se la loro espressione diventa costitutiva.

TSP-1 è un inibitore dell'angiogenesi legandosi a recettori transmembranari delle cellule endoteliali contrastando gli stimoli proangiogenici.

In passato si pensava che l'angiogenesi fosse importante solo se i tumori erano in rapida crescita. Dati più recenti indicano che l'angiogenesi contribuisce anche durante le fasi premaligne del processo neoplastico.

2.1.3.6 Malignità - invasività e metastasi

Fino al 2000, i meccanismi dell'invasività e della metastatizzazione erano in gran parte un enigma. Era chiaro che carcinomi derivanti dai tessuti epiteliali progredissero ai gradi più alti di malignità, fino all'invasione locale ed a metastatizzazione a distanza. Le cellule tumorali mostrano tipiche alterazioni associate alla loro forma, alla loro interazione con altre cellule e con la matrice extracellulare (ECM).

Il processo multistep d'invasione e metastatizzazione è stato schematizzato come una sequenza di passaggi discreti e ben definiti, talvolta chiamati anche invasione-metastasi a cascata. Questa rappresentazione prevede una successione di cambiamenti all'interno della cellula, a cominciare dall'invasione locale, intravasazione delle cellule tumorali nei vasi sanguigni e linfatici vicini e transito delle cellule tumorali attraverso i sistemi linfatico e sanguigno. Successivamente vi è la fuoriuscita di cellule tumorali dal lume vasale (extravasazione) con l'arrivo nel parenchima tissutale. Qui c'è la formazione di piccoli noduli di cellule tumorali (micrometastasi), ed infine la crescita delle lesioni a tumori macroscopici (Hanahan and Weinberg, 2011).

Cellule tumorali epiteliali guadagnano invasività e capacità migratorie nel processo di transizione mesenchimo-epiteliale (EMT), essenziale per una diffusione metastatica. Il processo EMT si pensa sia responsabile della diminuzione di efficacia di un trattamento e del fallimento della terapia antitumorale. Le cellule tumorali circolanti (CTC), isolate dal sangue di pazienti con carcinoma mammario, possono essere collegate alle cellule staminali tumorali (CSC) e ai processi di EMT in quanto possono avere caratteristiche di CSC così come presentare i cambiamenti fenotipici caratteristici di EMT. Complessivamente, queste cellule sono predestinate ad essere una fonte attiva di metastasi a causa delle loro potenziali caratteristiche staminali e tratti EMT che consentono a loro di diffondere in modo efficace (Ksiazkiewicz et al., 2012).

L'adesione cellula-cellula determina la polarità cellulare, partecipa alla differenziazione cellulare, alla creazione ed al mantenimento dell'omeostasi tissutale. Durante l'oncogenesi, questi fenomeni d'adesione sono modificati dai cambiamenti genetici ed epigenetici, causando così cambiamenti nel signaling cellulare, perdita d'inibizione da contatto e le alterate interazioni fra la migrazione cellulare e le cellule stromali. Un'importante classe di molecole d'adesione cellula-cellula è la

superfamiglia delle caderine. Il membro capostipite è l'E-caderina nota già dagli anni 90 come potente soppressore dell'invasione tumorale e di metastasi. Da allora molte caderine e proteine correlate alla caderina sono state individuate ed un numero crescente è stato implicato nel cancro, come soppressori tumorali presunti o come proto-oncogeni.

La downregolazione spesso osservata e le mutazioni che portano all'inattivazione di E-caderina nei carcinomi umani, hanno fornito un ruolo peculiare nella malignità (Berx and van Roy, 2009).

Il microambiente tumorale è un elemento non intrinseco al tumore, ma altrettanto importante e determinante la sua genesi e progressione.

Il ruolo del microambiente tumorale nel corso degli anni è divenuto via via sempre più importante. La massa tumorale possiede una pleora di cellule apparentemente non tumorali reclutate che permettono il mantenimento ed il consolidarsi degli "*hallmarks*" ovvero il microambiente tumorale. Vi sono differenti tipi cellulari connessi con la massa tumorale, come le cellule stromali associate al tumore. Queste sono cellule apparentemente non tumorali, pur essendo intimamente associate alla massa tumorale, che ne costituiscono lo stroma e diventano promotrici attive della trasformazione neoplastica.

Queste caratteristiche, includendo il microambiente tumorale, i cambiamenti metabolici e l'elusione del sistema immunitario, sono acquisite e mantenute durante la trasformazione neoplastica e l'acquisizione di potenziale tumorigenico. Studiando sempre più nel dettaglio gli "*hallmarks*", si potrà progredire sempre di più nella comprensione e nel trattamento delle neoplasie.

2.1.3.7 Cambiamenti metabolici del tumore.

I tessuti umani normali convertono la maggior parte dello zucchero (glucosio) che consumano ad acido piruvico tramite la glicolisi. La glicolisi è il processo metabolico mediante il quale, in condizioni di anaerobiosi, una molecola di glucosio è scissa in due molecole di piruvato al fine di generare 2 molecole di ATP e 2 molecole di NADH per ogni molecola di glucosio utilizzata. Il piruvato, traghettato nei mitocondri, sarà completamente ossidato a CO₂ ed acqua grazie al ciclo di Krebs ed alla fosforilazione ossidativa. L'energia libera derivata da questo processo, dipendente dall'ossigeno, è utilizzata per la sintesi di ATP da ADP e fosfato inorganico (Pi) grazie all'ATP sintasi. Questo grande complesso enzimatico, situato nella membrana mitocondriale interna, comprende i sistemi di sintesi e di trasporto di ADP e Pi. Complessivamente per ogni molecola di glucosio si sintetizzano 36 molecole di ATP ed un elevato potere riducente (Pedersen, 2007).

Le cellule normali in presenza di un adeguato apporto di ossigeno utilizzano principalmente la fosforilazione ossidativa per la sintesi di ATP, processo che avviene nei mitocondri. La glicolisi non necessita di ossigeno, ma la produzione di ATP è nettamente inferiore.

Otto Warburg osservò una caratteristica peculiare del metabolismo energetico tumorale. Anche in presenza di ossigeno, le cellule tumorali riprogrammano il metabolismo del glucosio e la loro produzione di energia, limitando così il loro metabolismo energetico in gran parte alla glicolisi chiamata "glicolisi aerobica" (Hanahan and Weinberg, 2011; Warburg, 1930; Warburg, 1956).

Una cellula tumorale, come le cellule in rapida divisione cellulare, necessitano di fonti di carbonio per sostenere la rapida proliferazione. La glicolisi e la via del pentoso fosfato sono fonti di precursori per la biosintesi degli acidi nucleici, fosfolipidi, acidi grassi, colesterolo e porfirine. Così, mantenendo una glicolisi elevata all'interno di ogni cellula tumorale, anche in presenza di ossigeno (effetto Warburg) non solo si assicura l'apporto nutrizionale al tumore ma anche la sua rapida crescita. Un secondo vantaggio dell'effetto *Warburg* è probabile sia rivolto alla protezione del tumore e dell'invasione. Le cellule tumorali attraverso glicolisi aerobica, anche in presenza di ossigeno, producono acido lattico e sono in grado di rilasciarlo all'esterno. Si potrebbe pensare che anche una sola molecola di glucosio, potrebbe essere convertita in acido lattico. Il pH acido può proteggere le cellule tumorali contro attacchi del sistema immunitario ed indurre effetti sulle cellule normali circostanti, preparandole così per l'invasione. Infine l'effetto Warburg assicura anche un tempo di sopravvivenza più lungo al tumore nel caso l'ossigeno possa diminuire, perché gli enzimi che catalizzano la glicolisi non dipendono direttamente da ossigeno. Inoltre i geni che le codificano per gli enzimi glicolitici in cellule tumorali sono attivati da condizioni d'ipossia. Il fatto che le cellule tumorali presentino l'effetto Warburg, potrebbe essere interpretato come un segno di longevità cellulare, anche in condizioni fortemente ipossiche (Hanahan and Weinberg, 2011; Pedersen, 2007). L'effetto *Warburg* e la concezione che le cellule tumorali abbiano un metabolismo alterato è stato per anni accantonato, per poi essere ripreso ed acquisire sempre più spazio. Il metabolismo energetico di una cellula tumorale è apparentemente illogico. Perché scegliere la glicolisi che ha una resa in produzione di ATP 18 volte inferiore rispetto alla fosforilazione ossidativa? Questo potrebbe essere spiegato attraverso l'upregolazione dei trasportatori del glucosio, in particolare GLUT1, che aumenterebbero l'*uptake* citoplasmatico di glucosio (Jones e Thompson, 2009) (Upadhyay et al., 2013).

L'incremento della glicolisi ha dimostrato essere associato con l'attivazione di oncogeni (per esempio, RAS, MYC) ed oncosoppressori (come ad esempio TP53), le cui alterazioni sono state selezionate principalmente per i benefici nel conferire *hallmarks* neoplastici quali: proliferazione cellulare, evitare controlli citostatici e mancanza d'eventi apoptotici.

L'aumento dell'efficienza glicolitica può essere ulteriormente accentuata in condizioni d'ipossia peculiare di molti tumori, upregolando i trasportatori del glucosio e gli enzimi glicolitici. Così, sia

l'oncoproteina Ras e che l'ipossia possono aumentare in modo indipendente i livelli dei fattori di trascrizione HIF1a e HIF2a, che a loro volta upregolano la glicolisi (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'effetto Warburg è il processo biologico sfruttato durante un'analisi PET. Il 2-fluoro2-deossi-D-glucosio (FDG) è l'analogo strutturale e radioattivo del glucosio utilizzato nell'analisi PET. FDG al C2 ha legato il ^{18}F . FDG entra nelle cellule tumorali tramite i trasportatori del glucosio GLUT1 e GLUT3 e fosforilato dall'esochinasi FDG-6-fosfato come se fosse glucosio, così da non poter più uscire dalla cellula. Il glucosio-6-fosfato subisce un'ulteriore isomerizzazione a fruttosio-6-fosfato nella via glicolitica o nell'ossidazione del 6-fosfogluconolattone nella via dei pentoso fosfati, a differenza del FDG-6-fosfato che non può essere ulteriormente catabolizzato a causa della mancanza di un atomo di ossigeno in posizione 2. L'efficacia del FDG come tracciante è vincolato sia all'espressione del trasportatore di glucosio che all'attività esochinasica e può fornire un modo per valutare la velocità di assorbimento di glucosio nelle cellule. In questo modo le cellule tumorali o in generale metabolicamente molto attive, incamerando glucosio più velocemente rispetto ai tessuti circostanti, saranno visualizzate in maniera non invasiva nei pazienti oncologici da FDG –PET (Hanahan and Weinberg, 2011; Pedersen, 2007).

2.1.3.8 Instabilità genomica e mutazioni.

L'instabilità genomica è una caratteristica di quasi tutti i tumori umani, ma in quale fase dello sviluppo del cancro nasce e qual è la sua base molecolare sono questioni a cui stiamo cominciando solo ora a rispondere (Negrini et al., 2010). Le mutazioni e le alterazioni geniche-genomiche sono alla base della trasformazione e progressione neoplastica; gran parte delle cellule tumorali presentano alterazioni cromosomiche. Questa caratteristica peculiare delle cellule tumorali, ha permesso che divenisse un importante campo di studi e ricerche. Le idee che mutazioni genetiche possano essere cause del cancro e che lo sviluppo di nuove tecniche molecolari per caratterizzare sempre la genetica del cancro hanno portato al paradigma gene-centrico. Questo propone che l'identificazione di mutazioni genetiche causali porteranno alla comprensione dei meccanismi molecolari del cancro ed a migliori trattamenti mirando a sovvertire l'effetto del gene mutato (Hanahan and Weinberg, 2011; Heng et al., 2013). Il concetto di gene come chiave della terapia e dell'insorgenza del tumore non è però riuscito. Progetti di sequenziamento del Genoma del Cancro hanno sequenziato migliaia di tumori ed hanno dimostrato in modo schiacciante che la stragrande maggioranza delle variazioni genetiche non sono condivise tra i pazienti. Questi risultati certamente sfidano l'attuale quadro della teoria del cancro (Vincent, 2011). In realtà, questo risultato era stato previsto all'inizio dell'era sequenziamento del genoma del cancro, in quanto ci si rese conto che l'attuale teoria della mutazione genica somatica si basa su alcuni tipi di cancro eccezionali definite

da un modello lineare di progressione come potrebbe esser CML (leucemia mieloide cronica). La maggior parte dei tumori solidi progredisce stocasticamente guidati da una spiccata alterazione genomica, mostrando una schiacciante eterogeneità ed una forte instabilità cromosomica (Heng et al., 2013). Alcuni genotipi mutanti possono conferire un vantaggio selettivo a cloni di cellule tumorali, consentendo loro di crescere e di poter esercitare una dominanza sul tessuto locale. Di conseguenza, la progressione del tumore *multistep* può essere rappresentata come una successione di espansioni clonali, ciascuna delle quali viene attivata dall'acquisizione abilitante di un genotipo mutante. La straordinaria capacità dei sistemi di controllo e di “manutenzione” del genoma volti a rilevare e risolvere i difetti del DNA, assicurano che i tassi di mutazione spontanea siano di solito molto bassi durante ogni generazione cellulare. Grazie all'acquisizione dei geni mutanti necessari per orchestrare la tumorigenesi, le cellule tumorali possono aumentare i tassi di mutazioni. Studi definiti *high-throughput* suggeriscono che pochissimi geni sono mutati, eliminati e/o amplificati in forme di cancro sporadico umano. Questi sono il soppressore tumorale TP53 e geni che regolano positivamente la crescita cellulare (come gli oncogeni EGFR e RAS) o negativamente (come i geni oncosoppressori CDKN2A e PTEN). Si pensava che l'inattivazione di TP53 avrebbe portato ad instabilità genomica. Tuttavia, la delezione del gene TP53 in modelli di topo e cellule umane non ha portato ad aneuploidie e nelle lesioni precancerose, l'instabilità genomica è presente prima della costruzione del mutante. Al contrario, l'attivazione di oncogeni, e più in generale delle vie di segnalazione della crescita cellulare, possono indurre la perdita di eterozigosi e l'instabilità genomica in cellule di mammifero *in vitro*, xenotrapianti umani ed in modelli di topo e lievito (Negrini et al., 2010).

2.2 CARCINOMA MAMMARIO

Il cancro al seno è il tumore femminile più comune e la principale causa di morte per cancro nelle donne. Nel 2012 il cancro al seno è stato il tumore maggiormente diagnosticato nelle donne in Europa (Ferlay et al., 2013). In molti paesi in via di sviluppo, tra cui Asia, Africa, Corea del Sud ed India, l'incidenza e la mortalità per il cancro al seno è aumentata; questo in relazione allo stile di vita sempre meno sano. Il mantenimento del controllo del peso, il condurre una vita sana minimizzano in modo considerevole l'incidenza di cancro al seno. La diagnosi precoce attraverso mammografia ha mostrato un aumento dei successi terapeutici, anche se questo approccio unito al costo elevato ha un grado di fattibilità molto basso per i paesi in via di sviluppo. La diagnosi precoce in questi paesi è legata ad una maggior consapevolezza dei primi segni (Jemal et al., 2011).

Negli ultimi anni, numerosi studi di proteomica su grande scala sono stati effettuati per caratterizzare l'intero proteoma del cancro al seno. Tuttavia, questa strategia porta ad un insieme di dati estremamente complessi, che rendono difficile identificare proteine sensibili e specifiche mirate per il cancro al seno (A R Green and J M Garibaldi, 2013). I tipi di cancro al seno più comuni sono: il carcinoma duttale nell'ordine del 85%-90% ed il carcinoma lobulare che ha un'incidenza dell'8% circa. Questi prendono il nome dall'area della mammella in cui si formano. La restante parte dei tumori mammari meno ricorrenti include il cancro al seno infiltrante ed infiammatorio (Munagala et al., 2011). Le pazienti affette da tumori responsivi agli estrogeni (ER) e/o al progesterone (PR), in quanto ne esprimono i recettori, hanno un minor rischio di mortalità dopo la diagnosi rispetto alle pazienti con tumori ER e/o PR negativo (Dunnwald et al., 2007). La principale classificazione dei tumori al seno è basata sulla rilevazione dei recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR). La presenza o l'assenza dei recettori ormonali, con l'aggiunta del fattore di crescita epidermico-2 (HER2) richiedono una sottoclassificazione molecolare più dettagliata dei tumori al seno (Rebecca Ritte1, 2013). Di seguito ne verranno riportati alcuni esempi. Sottotipi di tumore al seno sono definiti attraverso l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER), recettore del progesterone (PR), e HER2. Inoltre tumori ER negativi (ER-), PR negativi (PR-) ed HER2 negativi (-HER2), sono anche classificati come fenotipo triplo negativo (ER-/PR-/HER2-). I tumori che esprimono citocheratina 5/6 (CK5/6) o citocheratina 5 (CK5) e/o il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) rappresentano un altro sottotipo di tumore al seno, noto come CBP. Questo è caratterizzato da ER-/PR-/HER2-, CK5 o CK5/6 positivo ([CK5 o CK5/6] +), e/o EGFR positivo (EGFR+). CBP come gruppo istochimico è stato utilizzato per riepilogare i tumori mammari "basale-like" a cui può esser associata una prognosi a breve ed a lungo termine (Yang et al., 2011).

2.2.1 Incidenza e fattori di rischio

Secondo AIRC ogni anno ci sono circa trentamila nuovi casi di carcinoma mammario e negli ultimi sei anni c'è stato un incremento del 13.8%. Circa il 45% della riduzione della mortalità nei paesi occidentali, Italia compresa, può esser associata allo screening mammografico. Infatti negli ultimi 25 anni, nel nord America ed in diversi paesi europei, i tassi di mortalità dovuti a carcinoma mammario sono diminuiti sia grazie alla diagnosi precoce che a terapie più efficaci.

In Italia l'incidenza del cancro al seno varia in base alla posizione geografica. Con 115 casi su 100.000 donne (45.000 nuovi casi ogni anno), di cui il 29 % registrato come diagnosi di tumori maligni. Vi sono rilevanti differenze tra Nord, Centro e Sud Italia dovute sia allo screening mammografico che a diversi fattori di rischio es. diversi stili di vita (Clavarezza et al., 2012). Il Nord Italia ha uno stile di vita più simile a quello del Nord Europa e degli Stati Uniti rispetto al Sud Italia, paesi in cui si rileva un'incidenza di carcinoma mammario molto alta (Ferlay et al., 2013). In Italia il cancro al seno provoca più di 11.000 morti l'anno senza nessuna differenza rilevante tra Nord Centro e Sud Italia, anche se la sopravvivenza a 5 anni è compresa tra 85 % e il 87 % nel Nord e Centro Italia, rispetto al 81 % del Sud Italia. Questa differenza si ritiene esser dovuta alla diversa possibilità di accedere al programma di screening mammografico (Clavarezza et al., 2012).

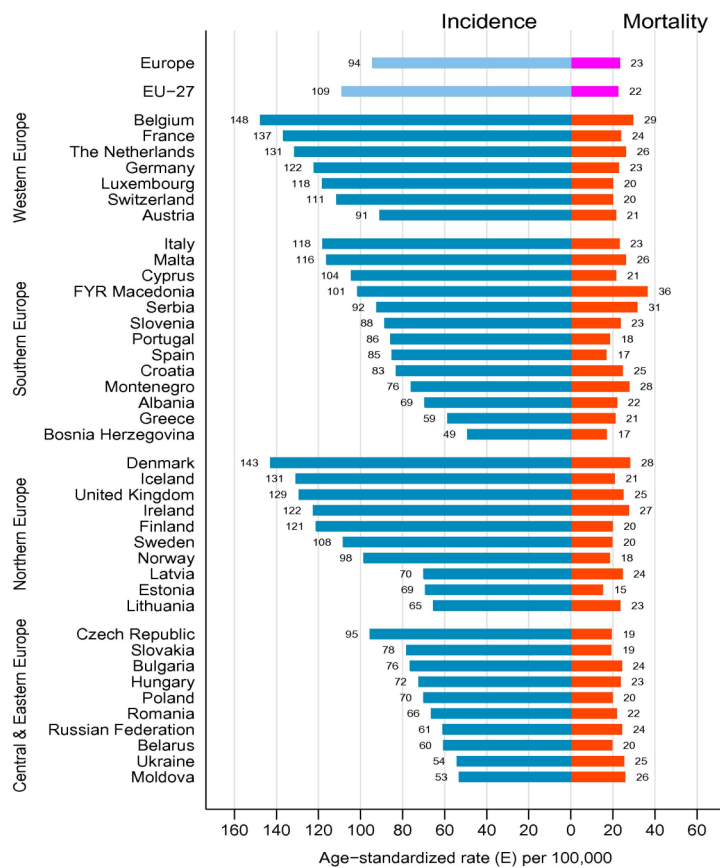


Figura 2.2: Incidenza e mortalità del il tumore al seno nei paesi Europei nel 2012. Tasso standardizzato per età, su 100000 donne.

In figura 2.2 è riportata l'incidenza in relazione alla mortalità per il carcinoma mammario in alcuni paesi. Come si può notare dalla figura 2.2 esiste una variazione d'incidenza e di mortalità in accordo con una chiara distribuzione geografica. Questi dati riflettono la variabilità delle politiche del sistema sanitario rispetto all'importanza della sensibilizzazione verso lo screening mammografico e/o le visite senologiche. Tra i diversi paesi variano i fattori di rischio, le disparità dello sviluppo socio-economico e le misure di controllo del cancro (Ferlay et al., 2013).

Il carcinoma mammario è una malattia molto complessa caratterizzata da molteplici alterazioni molecolari. Tuttavia i differenti comportamenti e risposte alla terapia, anche all'interno delle stesse tipologie di tumori, indicano che i fattori prognostici che abbiamo a disposizione sono insufficienti nel riflettere le eterogeneità neoplastiche. È noto che la diagnosi precoce ed il tempestivo intervento potrebbero migliorare drasticamente la sopravvivenza del paziente a 5 anni. Attualmente diversi approcci, come mammografia, sono stati applicati nella diagnosi del tumore mammario. Tuttavia, questi approcci diagnostici comuni si possono rivelare talvolta insoddisfacenti. Pertanto, vi è un'urgente necessità di trovare approcci diagnostici sempre più mirati e tempestivi.

Diversi sono i fattori di rischio caratteristici del carcinoma mammario ed è molto importante capire come lo stile di vita, le componenti genetiche e la storia clinica delle pazienti possa aiutare nella prevenzione, nella diagnosi e nel trattamento della patologia.

Fattori che influenzano la durata dell'esposizione cumulativa agli ormoni durante la vita riproduttiva, come l'età del menarca, l'età del primo parto, il tempo tra l'età del menarca e il primo parto, il numero di figli, l'uso di contraccettivi orali (OC) e l'allattamento sono stati suggeriti essere associati a rischio di tumori responsivi alla terapia ormonale HR-positivi (ER+ oppure ER+ PR+ insieme). Tuttavia, i fattori di rischio per carcinomi HR-negativi (ER-; PR-; ER-/PR-) e le eziologie di HR positivi ed HR negativi rimangono ancora poco chiare. Vi sono studi epidemiologici però che dimostrano come in età post menopausa l'incidenza di tumori HR-negativi diminuisce molto, suggerendo una correlazione fra ormoni sessuali prodotti durante i cicli ovarici e l'insorgenza di tumori HR-negativi (Rebecca Ritte1, 2013). L'evidenza epidemiologica suggerisce che le associazioni tra rischio di cancro al seno, fattori di rischio genetici e non, variano a seconda della patologia tumorale. Tumori CBP mostrano caratteristiche insolite che includono la correlazione tra portatrici di BRCA1 mutato e le donne afro-americane. Carcinomi CBP sono associati a specifici modelli istologici, quali il carcinoma midollare o metaplastico. Caratterizzare le associazioni tra i fattori di rischio di cancro al seno e sottotipi di tumore a cui si riferiscono possono consentire una migliore valutazione dei rischi per specifici sottotipi di tumore. Ciò può portare alla diagnosi precoce e mirata del cancro al seno e l'attuazione di strategie di prevenzione (Yang et al., 2011). Stili di vita ad alto rischio come il fumo, eccessivo consumo di alcool, scarsissima attività fisica ed

una dieta povera, sono fattori collegati a tassi elevati d'incidenza di cancro al seno. Vi sono evidenze sperimentali connesse tra il miglioramento dello stile di vita dopo una diagnosi di cancro al seno ed un ridotto tasso di mortalità (George et al., 2011). Al contrario, tra i malati di cancro, l'adozione di stili di vita sano è associato ad un miglioramento della sopravvivenza, minori rischi di recidive e secondi tumori, ridotta mortalità per cancro ed una migliore qualità della vita. Rispetto alle donne fisicamente inattive sia prima che dopo la diagnosi di tumore al seno, le donne con diagnosi di cancro al seno che hanno incrementato l'attività fisica dopo la diagnosi mostravano un rischio di morte inferiore al 45%. Le donne che diminuiscono l'attività fisica dopo la diagnosi mostrano un rischio di morte triplicato (Zhao et al., 2013).

2.2.2 Approcci terapeutici del carcinoma mammario

Attualmente il cancro al seno non è più considerato come una singola malattia. Differenti sottotipi neoplastici possono essere definiti attraverso test genetici o attraverso l'immunoistochimica. I sottotipi tumorali hanno peculiari fattori di rischio epidemiologico, diverse storie naturali e risposte diverse alle terapie sistemiche e locali. Queste differenze portano i medici che si occupano di cancro al seno a prendere in considerazione i singoli casi all'interno dei vari sottotipi, al fine di valutare gli elementi di prova pertinenti ed arrivare ad un adeguato approccio terapeutico (Goldhirsch et al., 2011).

2.2.2.1 Chemioterapia contro il cancro al seno

Il cancro al seno è una malattia estremamente eterogenea, diversi aspetti tumorigenici ed un disparato comportamento clinico la caratterizzano. Le differenti alterazioni molecolari caratterizzano la crescita, la sopravvivenza e la risposta al trattamento. Farmaci chemioterapici disponibili per il trattamento del cancro al seno possono essere divisi in agenti alchilanti come ad esempio: cisplatino, carboplatino, ciclofosfamide. Abbiamo le antracicline: doxorubicina, epirubicina e idarubicina. Gli alcaloidi vegetali quali paclitaxel, vinorelbina, vindesina e gli inibitori della topoisomerasi: irinotecan, etoposide e teniposide (Figura 2). Nonostante i significativi progressi nella diagnosi precoce e costante progresso nel trattamento con farmaci sistemici, la maggior parte dei tumori al seno sviluppano resistenza ai farmaci. Negli ultimi anni, la comprensione dei meccanismi biologici sottostanti la carcinogenesi e gli eventi molecolari alterati hanno portato all'identificazione di nuovi bersagli molecolari e sviluppo di terapie mirate. Negli ultimi due decenni, diversi anticorpi monoclonali e molecole inibitori sono stati sviluppati e testati attraverso studi clinici.

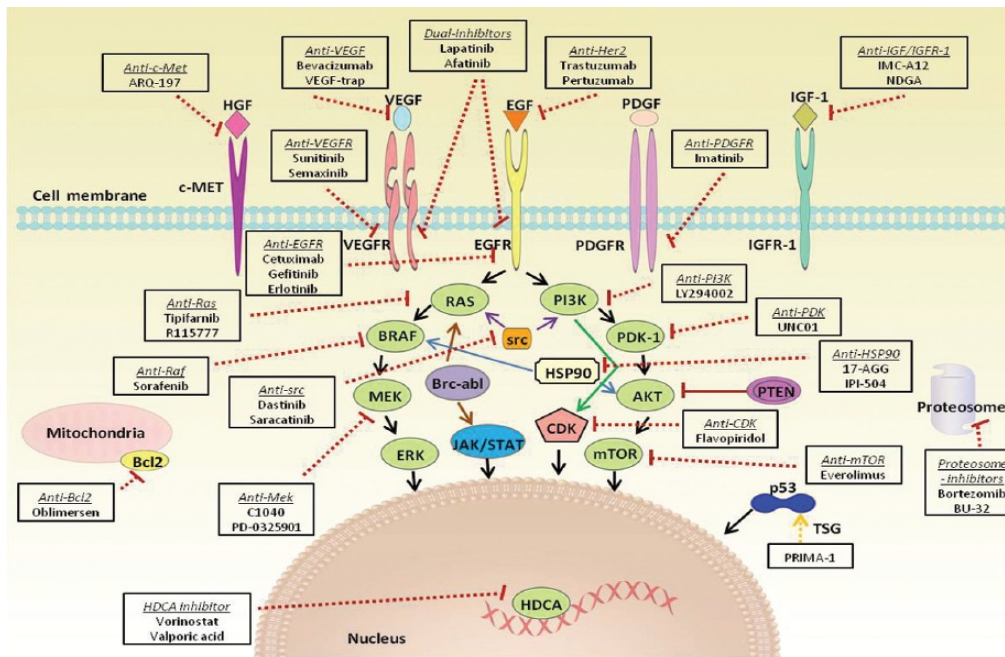


Figura 2.3: Pathways intracellulari di trasduzione del segnale implicati nella proliferazione e progressione del cancro al seno. Terapie mirate ed i relativi processi sono qui rappresentati. EGF - fattore di crescita epidermico; EGFR - recettore EGF; HGF - fattore di crescita degli epatociti; c-MET - fattore di transizione mesenchimale – epiteliale; PDGF - fattore di crescita derivato dalle piastrine; PDGFR - recettore PDGF; IGF-1 - insulin-like growth factor-1; IGF-1R - IGF-1 recettore; PI3K - fosfatidilinositolo 3-chinasi; Ras - Rat sarcoma sottofamiglia delle GTPasi; AKT - proteina chinasi B; PDK1 - piruvato deidrogenasi chinasi isoenzima 1; mTOR - bersaglio della rapamicina nei mammiferi; MEK – mitogen activated protein chinasi; VEGF - fattore di crescita vascolare endoteliale; VEGFR - recettore VEGF; BRAF - RAF chinasi di tipo B; src-v - virus del sarcoma di Rous tirosin-chinasi ; BCRABL - il cromosoma Philadelphia; JAK/STAT - Janus chinasi/trasduttori del segnale ed attivatori trascrizionali; PTEN - fosfatasi e tensin omologhi; HDAC - istone deacetilasi.

I loro bersagli sono: la crescita cellulare, la sopravvivenza, l'angiogenesi ed il fenomeno della metastatizzazione. Molti di questi agenti mirati hanno migliorato la sopravvivenza dei pazienti. Uno dei primi e più sviluppato nel campo della terapia mirata con trastuzumab è un anticorpo monoclonale (Mab) anti HER2 e si è rivelato efficace nel trattamento delle donne con tumore al seno HER2 - positivo. In tempi più recenti è stato sviluppato il lapatinib. Questo è un inibitore reversibile e selettivo sia di HER1 che di HER2 e bevacizumab, un anticorpo monoclonale contro il fattore di crescita vascolare endoteliale VEGF. Inoltre sia HER2 con trastuzumab e VEGF con Bevacizumab, in combinazione con la chemioterapia, è diventata una nuova strategia terapeutica molecolare mirata nel carcinoma mammario. Altri target molecolari tirosin-chinasici (come Src) sviluppati negli ultimi tempi sono il fattore di crescita insulino-simile (IGF)/IGF-recettore (IGFR), gli inibitori PI3K/Akt/mTOR, inibitori del pathway RAS/MEK/ERK; agenti che promuovono l'apoptosi come poli ADP ribosio polimerasi (PARP) ed agenti inibitori dell'invasività e metastatizzazione come inibitori di MMP (metalloproteinasi) (Figura 2.3) (Munagala et al., 2011).

2.2.2.2 Radioterapia nel trattamento del cancro al seno

Il cardine del trattamento al tumore al seno è la chirurgia, combinata alla radioterapia (RT) e trattamenti oncologici sistemici. A seconda delle caratteristiche del tumore e le preferenze del paziente, la chirurgia conservativa al seno e la mastectomia sono le opzioni chirurgiche al momento più efficaci. Il trattamento radioterapico è una pratica clinica ormai assodata nel trattamento del tumore al seno. Grazie alla significativa riduzione del rischio di recidiva del 12% per i pazienti con 1-3 linfonodi ascellari positivi grazie alla PMRT (radioterapia post mastectomia), il numero di pazienti trattati con PMRT sono in aumento. Tuttavia sono però noti i fattori di rischio connessi con la radioterapia in seguito ad un immediato intervento ricostruttivo del seno (Eriksson et al., 2013).

Il concetto di cellule tumorali radiosensibili e radioresistenti è ben riconosciuto. Con la nuova caratterizzazione dei diversi fenotipi molecolari tumorali del cancro al seno, i medici e radiobiologi si sono avvicinati sempre più al concetto delle curve dose-risposta. Questi cambiamenti genetici hanno un'impronta prognostica che si traduce in risposte diverse a vari trattamenti e sopravvivenza, ma l'entità del loro effetto sulla risposta radioterapica è da poco esplorato. La sostanziale eterogeneità delle mutazioni sul DNA tra i tumori al seno può spiegare le grandi differenze di fenotipi, sia in termini di comportamento del tumore, così come responsività alla terapia. Questi risultati aprono una strada terapeutica nel trattamento e forniscono strategie antitumorali non utilizzabili prima. Ciò ha stimolato un nuovo interesse nel rivisitare i processi di riparazione al DNA da danni da radiazioni. I dati indicano che le vie di segnalazione HER2, EGFR/PI3K/Akt giocano un ruolo fondamentale nella modulazione della sopravvivenza post-irraggiamento. Questi percorsi sono coinvolti nella radiosensibilità, nella proliferazione tumorale e nell'ipossia. Pertanto, agendo su questi meccanismi si potrebbe arrivare a trattare efficacemente cloni cellulari radioresistenti (Kaidar-Person et al., 2013).

La radioresistenza rimane una barriera per raggiungere la massima efficacia mediante la radioterapia del cancro al seno. La radioresistenza può essere presente all'inizio della terapia, causando nei pazienti una non responsività iniziale al trattamento (radioresistenza intrinseca), o può emergere nel tempo durante radioterapia (radioresistenza acquisita) che si traduce poi nel fallimento del trattamento. In radioterapia il frazionamento è spesso usato per facilitare il recupero dei tessuti normali. È l'apoptosi, o morte cellulare programmata, il meccanismo di morte cellulare indotto da radiazioni in cellule cancerose. Esso è regolato da complesse interazioni tra le proteine anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, e proteine pro-apoptotiche, tra cui Bax, Bak, Bad e Bim. La *down* regolazione delle proteine anti-apoptotiche può promuovere l'apoptosi e migliorare la radiosensibilità delle cellule tumorali. L'interruzione di percorsi anti-apoptotici è un nuovo bersaglio per superare radioresistenza nel tumore al seno (Li et al., 2012).

In seguito alla chirurgia conservativa al seno, alcune foci microscopiche potrebbe rimanere nella porzione del seno preservata dalla chirurgia. Lo scopo della radioterapia è quello di sradicare questi focolai ed evitare che recidive locali possano in seguito portare a metastasi a distanza. Dopo la chirurgia, la radioterapia all'incirca dimezza il rischio di recidiva in una vasta gamma di pazienti (Matthijs V. Nijenhuis 2013). Tramite un trattamento radioterapico ideale si massimizza il rapporto tra dose somministrata al tumore rispetto al tessuto normale circostante, anche se per molti tumori esiste una chiara relazione tra dose di radiazione somministrata e la probabilità di controllo del tumore stesso, anche se la dose al tumore è spesso limitata dalla tolleranza alla radiazione delle strutture circostanti. A questo riguardo viene in aiuto la radioterapia ad intensità modulata (IMRT). È uno dei più importanti progressi in oncologia degli ultimi dieci anni. Miglioramenti in termini di tecnologia informatica e di tecniche di *imaging* hanno consentito il rapido sviluppo di questa modalità di trattamento. Ciò fornisce la possibilità sia di ridurre la tossicità tardiva e l'aumento della dose erogata potrebbe portare ad un migliore controllo del tumore ed aumentare le probabilità di sopravvivenza (Taylor and Powell, 2004).

2.3 APPROCCI DI STUDIO

Lo studio del K:D-rib, soluzione acquosa di D-ribosio e KHCO_3 , è stato condotto sfruttando le potenzialità che un approccio multidisciplinare può fornire. Da un lato il lavoro è stato caratterizzato dall'utilizzo di tecniche tipiche della biologia cellulare. Si sono estrapolate informazioni relative al comportamento di due modelli cellulari, se trattati con il K:D-rib. L'approccio cellulare ha previsto l'utilizzo di due linee cellulari Hs-578T (carcinoma mammario umano) e Hs-578Bst (epitelio mammario umano non tumorale) descritte nel paragrafo 2.3.1. Mentre l'approccio di tipo strutturale ha permesso di studiare il K:D-rib, i suoi componenti, e caratterizzare la miscela sotto l'aspetto del suo potere "antiossidante" [1]. Inoltre si è iniziato a studiare il K:D-rib come latore del folding di sequenze nucleotidiche a DNA ricche di guanina (PS2.M e PS5.M) in G-quadruplex, descritti nel paragrafo 2.3.2 [1-3].

2.3.1 Modelli cellulari

Il cancro al seno è la principale causa di morte nelle donne in tutto il mondo con un'incidenza annuale di circa 1,38 milioni [4]. Secondo l'American Cancer Society il tumore al seno è il tumore più comune nelle donne americane, eccetto il melanoma. Si è stimato che circa 1 donna su 8 (12%) svilupperà un carcinoma durante la sua vita. Secondo WHO (World Health Organization) il cancro al seno è il tumore con maggior incidenza nelle donne sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli economicamente avanzati. L'incidenza nei paesi in via di sviluppo è aumentata con l'allungamento della vita media (il tumore al seno ha un'incidenza maggiore nelle donne tra i 50 anni ed i 75 anni), all'intensa urbanizzazione ed al progressivo tendere ad uno stile di vita molto simile ai paesi economicamente più evoluti.

Gli importanti dati epidemiologici uniti all'incidenza del carcinoma mammario sempre più in aumento, hanno portato a condurre questi studi su due modelli cellulari quali il carcinoma mammario (HTB-126) Hs578T e l'epitelio mammario umano non tumorale (HTB-125) Hs 578 Bst. La linea HTB-126 deriva da un carcinosarcoma umano di origine epiteliale. Dalla stessa paziente, donna caucasica di 72 anni, è stata stabilizzata anche la linea cellulare non tumorale HTB-125. Quest'ultima d'origine mioepiteliale, costituiva il tessuto periferico al tumore, talvolta definito anche come tessuto stromale [5]. Quest'aspetto è molto importante in quanto si possono trarre valutazioni su come due modelli cellulari diversi, ma provenienti dalla stessa persona, reagiscono al trattamento con K:D-rib.

2.3.2 G-quadruplex

In biologia molecolare sequenze nucleotidiche ricche in guanina possono formare una struttura planare chiamata tetrade, formata da un appaiamento di quattro guanine. Due o più tetradi impilate una sopra l'altra possono formare i G-quadruplex (noti anche come G-tetradi o G4-DNA). La struttura dei G-quadruplex è ulteriormente stabilizzata dalla presenza di un catione, soprattutto potassio, posizionato nel canale centrale tra una tetrade e la successiva ed essere formati da sequenze di DNA, RNA, LNA e PNA. Possono essere intramolecolari, biomolecolari, o tetramolecolari, a seconda del numero dei filamenti che partecipano alla struttura G-quadruplex. Ed in base alla direzione dei filamenti formanti le tetradi, queste strutture possono essere descritte come parallele o antiparallele (figura 2.4) [6-8].

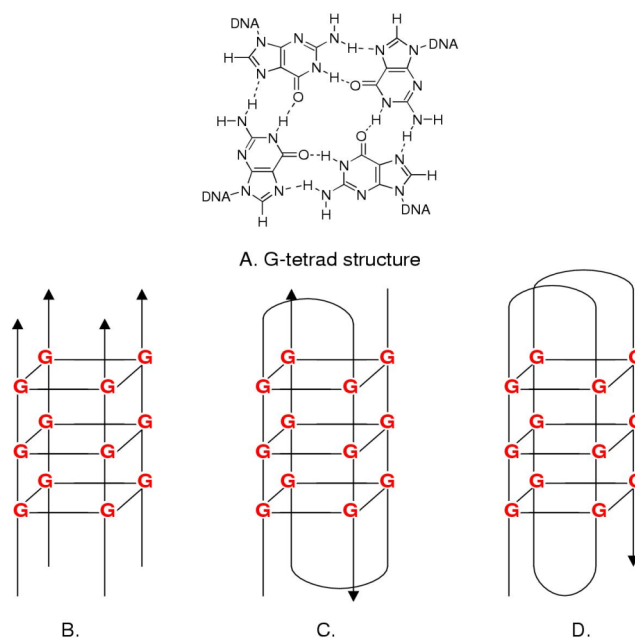


Figura 2.4 Esempio di G-Tetradi e G-quadruplex. A) G-tetrade in cui quattro basi guanina in una disposizione planare sono appaiate con legami idrogeno secondo Hoogsteen; B) G-quadruplex formati da quattro filamenti di DNA paralleli c) G-quadruplex intermolecolari. Due sequenze di DNA con ripetizioni di guanine formano forcine che dimerizzano stabilizzando la struttura biomolecolare. D) G-quadruplex intramolecolare anti-parrallelo in cui un singolo filamento di DNA, con quattro ripetizioni ricche in guanine, si possono piegare su se stesse per formare una struttura G-quadruplex [7].

I G-quadruplex si possono formare sia nelle sequenze telomeriche che in promotori di geni [8-10]. Come precedentemente descritto l'unità fondamentale del G-quadruplex è la tetrade di guanine in cui otto legami idrogeno (N1-O6, N2-N7) con gli O legati ai C6 rivolti verso il centro della tetrade (appaiamenti di Hoogsteen e Watson-Crick) stabilizzano la tetrade formando una struttura simile ad una gabbia antipiramidale bipiramidale [11-13]. I residui di guanina in una tetrade possono adottare

conformazione syn o anti, a seconda di come la base azotata è legata al C1 del deossiribosio. Nel G-quadruplex parallelo le guanine adottano la stessa conformazione mentre in quelli antiparalleli i G-quadruplex adottano conformazione opposta [11]. La tetrad può formare una struttura estesa sfruttando l'aromaticità degli anelli benzenici, ulteriormente stabilizzata dall'associazione con ioni metallici che s'intercalano nel canale centrale. La cavità può ospitare una varietà di cationi metallici che influenzano fortemente non solo la topologia finale del G-quadruplex ma anche la sua stabilità. L'influenza e la stabilità del metallo è legata all'aumentando del raggio atomico. Come si può notare maggiore sarà il raggio atomico e maggiore sarà la stabilità che il metallo conferisce; infatti Li, Na e K hanno la seguente affinità: $Li^+ < Na^+ < K^+$ [11, 13].

I G-quadruplex possono anche avere ruoli biologici. La proteina RAP1, ad esempio, si lega al DNA telomerico di lievito per promuovere la formazione di un G-quadruplex parallelo. In oltre, nuclease-hypersensitivity element III (segmento di acido nucleico ricco in guanine) presente nella regione del promotore del gene c-myc, forma G-quadruplex intramolecolari ed antiparalleli. Il ruolo biologico dei G-quadruplex ha spinto la progettazione di farmaci aventi come bersaglio queste strutture, ma ha anche fornito un impulso per l'utilizzazione dei G quadruplex stessi come agenti terapeutici [14].

2.3.2.1 G-quadruplex telomerici

I telomeri sono complessi nucleo-proteici specializzati che si trovano alle estremità del DNA degli organismi eucariotici. Forniscono protezione contro la digestione e la perdita del DNA dovuta alle endonucleasi ed al susseguirsi dei cicli cellulari. I telomeri inoltre evitano che le estremità del DNA si possano unire generando aberrazioni cromosomiche. I telomeri umani sono ripetizioni in tandem della sequenza TAAGGG fino ad ottenere una lunghezza di 5-10 kb che terminano con un'estremità 3' protrudente di 35-600 basi [15, 16]. Il DNA telomerico è associato a proteine quali Pot1, TRF1 e TRF2, TIN2, Rap1 e TPP1. La struttura e la stabilità telomerica è correlata a tumori, età (n° di cicli che la cellula ha compiuto) e stabilità genetica.

La struttura della sequenza telomerica umana wt 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' (wtTel22) in soluzione in presenza di ioni Na⁺, è stata analizzata tramite NMR. È stata vista una struttura a cesto, intramolecolare, con un mix di topologie parallele ed antiparallele. Le tre tetradi, formate da 4 guanine ciascuna, sono unite da due TAA loop laterali ed uno diagonale. Della stessa sequenza, è stata risolta la struttura cristallina in presenza di K⁺ ed è stato visto che dava una topologia tutta parallela ed intramolecolari come riportati in figura 2.5. Sono presenti tre tetradi di guanina connesse con quattro TAA loop di cui due laterali, uno diagonale ed uno fiancheggiante la struttura [17]. Ulteriori studi hanno mostrato che la struttura reale della sequenza wt22Tel è un ibrido di due strutture, in equilibrio dinamico fra di loro, anche in presenza di un'alta concentrazione di ioni Na⁺.

Ogni ibrido strutturale ha un suo distinto *capping* che può diventare a sua volta un bersaglio terapeutico in quanto sito di legame per farmaci o molecole stabilizzatrici. Le conformazioni ibride suggeriscono che la struttura telomerica potrebbe essere un assemblaggio in più conformeri perfettamente impacchettati [11].

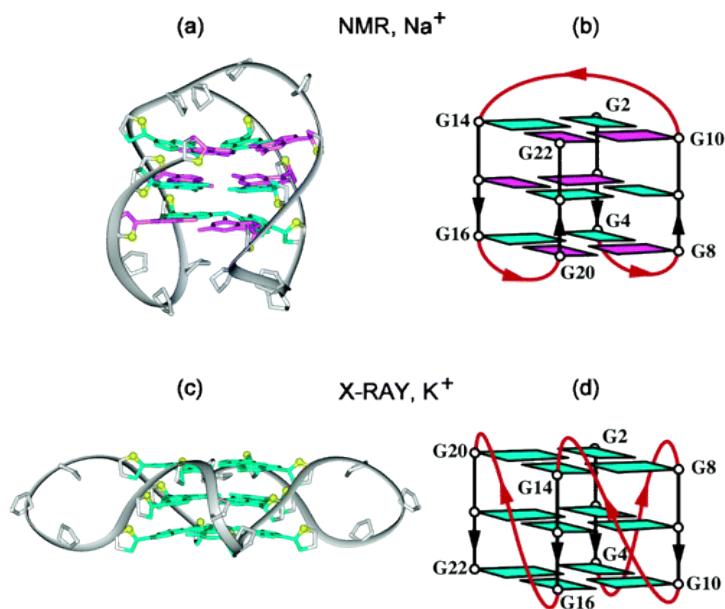


Figura 2.5: Strutture intramolecolari di G-quadruplex formate dalla sequenza telomerica umana. **a** e **b** in presenza di Na⁺ ed in soluzione. **c** e **d** cristalli in presenza di K⁺. I loop sono di colore rosso; guanine *anti* e *syn* e sono rispettivamente di colore verde e magenta. Gli atomi O in 4' sono di colore giallo [17].

2.3.2.2 G-quadruplex non telomerici

Studi biofisici *in vitro* su strutture G-quadruplex hanno permesso la formulazione di algoritmi predittivi. L'uso di tali algoritmi come QuadParser [13] e G4P calcolatore [14], ha dimostrato che motivi quadruplex prevalente nei genomi sono presenti in regioni associate alla regolazione genica (compresi promotori), introni e UTR. Queste analisi bionformatiche e biofisiche hanno gettato le basi per confermare sperimentalmente la presenza di queste strutture nelle cellule [18]. Il comportamento dinamico del G-quadruplex nel DNA a doppio filamento potrebbe essere direttamente coinvolto nella regolazione genica a livello trascrizionale, come proposto dal modello in figura 2.6. La possibilità che questo dinamismo regoli l'attività genica è supportata dalla scoperta di un motivo a G-quadruplex all'interno della sequenza promotrice del gene della β -globina di pollo ed in promotori di altri oncogeni [9]. Alcuni esempi paradigmatici di G-quadruplex non telomerici sono riportati di seguito. Prendiamo in esame il caso del promotore dell'oncogene bcl-2. L'estremità 5' del promotore P1, includendo una regione altamente ricca GC, è stata implicata nella regolazione della trascrizione di bcl-2. Questa è una sequenza di 39 paia di basi che si trova tra la 58esima e la

19 esima base a monte del promotore P1. Una delezione o mutazione di questo elemento ha dimostrato di aumentare l'attività del promotore da 2,1 volte fino a 2,6 volte. Questo filamento ricco in G, in presenza di K^+ , può formare una miscela di tre distinte strutture di G-quadruplex intramolecolari. È significativo notare che il G-quadruplex di bcl-2 rappresenta un'altra struttura terziaria a DNA ben definita assieme a c-MYC. Inoltre, è interessante notare che sia sequenze promotrici di bcl-2 che c-Myc contengono lo stesso motivo GGGN₂GGG, che ha come motivo strutturale una doppia catena parallela inversa. Fatto molto interessante è che le regioni promotrici di VEGF e di HIF-1R contengono lo stesso motivo suggerendo la formazione di un G-quadruplex parallela [19].

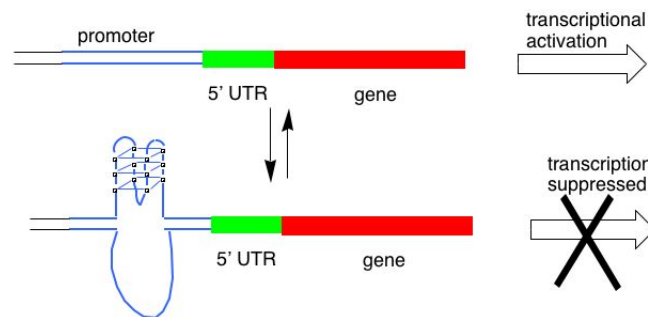


Figura 2.6: Modello proposto della regolazione della trascrizione genica da parte dei G-quadruplex

2.4 CARATTERISTICHE CHIMICHE E BIOLOGICHE DEL D-ribosio

Il D-ribosio è uno zucchero a cinque atomi di carbonio, molecola tanto semplice quanto importante per la vita degli organismi viventi. Il D-ribosio esiste in natura nella forma D, che differisce dalla forma L sono nei gruppi legati al C1 ed al C5; la forma L è sintetizzata solo per scopi farmaceutici e non è presente in natura. Nel RNA, il D-ribosio contribuisce a formare un sistema di catene e fornisce la base per la struttura tridimensionale che trasmette l'informazione. L'elica destrorsa del RNA deriva dalla chiralità del D-ribosio ed un attento confronto tra RNA e il suo enantiomero costituito da L-ribosio fornisce informazioni in merito alla funzione biologica di questo acido nucleico [20]. Il D-ribosio è elemento strutturale di nucleotidi necessari per la vita della cellula (es ATP), di cofattori e coenzimi (es. NAD, FAD) e di secondi messaggeri (es. cAMP).

La via dei pentoso fosfati, è una via metabolica in cui viene prodotto NADPH per le biosintesi riduttive e ribosio5-P per la biosintesi dei nucleotidi, in accordo con il fabbisogno della cellula.

Questa via è finemente regolata in relazione all'aumento di NADPH e D-ribosio-5-P rispetto al fabbisogno della cellula [21]. Non ci sono evidenze definitive che provino una connessione fra la disponibilità di R5P (α -D-ribosio 5-fosfato, elemento iniziale per la biosintesi delle purine) e la sintesi dei nucleotidi. Tuttavia è ipotizzabile che il fornire D-ribosio dall'esterno potrebbe aumentare la concentrazione di 5-PRPP (5-fosforibosyl- α -pirofosfato) ed in questo modo aumentare la sintesi di purine e pirimidine in tempi di bisogno [20, 22]. Molti analoghi strutturali dei nucleosidi contenenti D-ribosio, sono stati sviluppati come agenti antivirali e antitumorali sfruttando quelle che sono le vie metaboliche di questo zucchero [20].

La permeabilità degli zuccheri è un aspetto molto interessante ed è sempre più oggetto di studi. Sacerdote e Szostak investigarono sulla permeabilità del D-ribosio e di alcuni suoi diastereoisomeri (arabinosio, xylosio e lixosio) trovando una marcata permeabilità del D-ribosio rispetto agli altri. Questo fenomeno è stato osservato in doppi strati fosfolipidici quali POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) ed in membrane più semplici costituite da acidi grassi quali acido miristico ed acido oleico. In accordo con simulazioni di dinamica molecolare, che hanno confermato altri dati sperimentali, Wei et al., hanno confermato che il D-ribosio permea più velocemente attraverso POPC rispetto agli altri suoi diastereoisomeri. Differenze nella permeabilità di membrana ad aldopentosi possono essere spiegate, almeno in parte, dai ponti idrogeno tra i gruppi ossidrilici degli zuccheri e porzioni della membrana che chimicamente favoriscono questi legami. Queste interazioni sembrano essere più forti tra D-ribosio e membrana, fornendo così una maggiore stabilità ed una più veloce diffusione dello zucchero rispetto agli altri [23].

Le interazioni fra carboidrati e composti inorganici (es. cationi metallici) sono ambiti di ricerca molto interessanti. Questi sono dovuti all'importanza chimico-biologica dei complessi che si formano. La formazione del complesso zucchero - sale è da imputarsi all'interazione fra il catione (derivante dalla dissociazione del sale) ed i gruppi -OH dello zucchero [24]. L'interazione del D-ribosio con anioni è oggetto di ricerche ed interessi scientifici, dovuti anche al suo presunto ruolo nell'ambiente prebiotico [25]. Nel 2005 Ortiz et al., usarono ^1H and ^{13}C NMR per studiare la speciazione del D-ribosio in soluzione acquosa ed emersero quattro differenti isomeri strutturali: α - and β -furanosio, nella misura di circa il 20% of D-ribosio in soluzione acquosa ed i più stabili α - and β - piranosio corrispondenti al rimanente 80% (Figura 2.7). La catena aperta, indispensabile affinché si possa passare da una struttura all'altra, è presente in misura del 0.2% del totale; normalmente non è rilevabile [24].

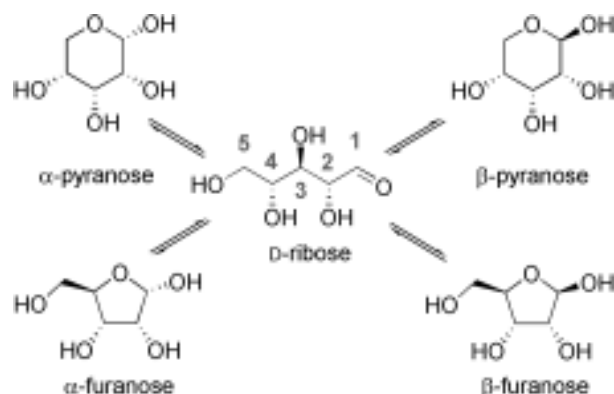


Figura 2.7: Strutture del D-ribosio in soluzione acuosca: miscela di α -e β -piranosio e α -e β -furanosio con la forma β -piranosica predominante

2.5 CARATTERISTICHE CHIMICHE-BIOLOGICHE DEL POTASSIO

Il potassio il cui simbolo è K (deriva dal latino kassium ossia alcali), ha numero atomico 19, numero di massa 39, appartiene al primo gruppo (metalli alcalini) ed al quarto periodo. Ha un raggio atomico di 2.77\AA , un volume atomico di $45.46\text{ cm}^3/\text{mol}$ ed ha un raggio covalente di 2.03 \AA *EnvChemistry.com*. È un metallo molto reattivo e si trova in natura in differenti minerali ed è presente anche nell'acqua di mare.

Lo ione potassio è uno degli ioni più importanti per l'organismo umano. È essenziale per prevenire la contrazione muscolare ed interviene nella genesi e nel mantenimento del potenziale d'azione. Lo ione K^+ costituisce lo 0.4% circa della massa del corpo umano ed è il catione intracellulare più abbondante. La concentrazione fisiologica intracellulare è di circa 150 mM, mentre quella extracellulare è di circa 7 mM [1, 26]. I livelli di potassio nel siero, in condizioni fisiologiche, sono tra 3.8 ed i 5.4 mmol/L [30]. K^+ gioca diversi ruoli in svariati processi biologici tra cui contrazione muscolare, battito cardiaco, trasmissioni nervose ed è implicato nelle funzioni renali. Anomale fluttuazioni di K^+ possono esser indicatori precoci di malattie come: alcolismo, anoressia, bulimia, malattie cardiache, diabete, AIDS e cancro. Eritrociti e cellule epidermiche possono contenere più K^+ intracellulare, rispettivamente tra 200 e 475 mmol. Per i miociti, la concentrazione intracellulare di K^+ è addirittura superiore, arrivando all'ordine delle moli [27].

2.5.1 Canali Potassio, Pompe Na^+/K^+ e cancro

Come descritto nel capitolo degli *hallmarks* vi sono forti connessioni fra proliferazione cellulare, canali del potassio e concentrazioni di potassio/sodio. Evidenze epidemiologiche suggeriscono che un elevato apporto di K^+ inibisce lo sviluppo del cancro, e un elevato apporto Na^+ aumenta l'incidenza di tumori maligni gastrointestinali. Studi derivati dall'analisi di neoplasie epiteliali umane, indicano che la deplezione da K^+ è presente in queste neoplasie e che questo potrebbe contribuire all'aumento intracellulare dello ione Na^+ alterando così il rapporto Na^+/K^+ all'interno della cellula [27, 28]. Nelle cellule tumorali la concentrazione di K^+/Na^+ non è finemente regolata ed un aumento dell'espressione e dell'attività della pompa Na^+/K^+ è stata mostrata in pazienti con cancro allo stomaco ed alla vescica. È stato osservato che livelli di attività dell'ATPasi Na^+/K^+ erano altamente ridotti in una forma invasiva di carcinoma renale umano, cancro uroteliale ed altre linee cellulari di carcinoma stabilizzate da vari tessuti. È probabile che quest'alterazione d'espressione dell'ATPasi Na^+/K^+ sia connessa con la malignità del tumore [28]. L'ATPasi Na^+/K^+ utilizza energia derivante dall'idrolisi di ATP per trasportare K^+ nelle cellule e Na^+ all'esterno entrambi contro gradiente di concentrazione. Il Na^+ se trasportato secondo gradiente, fornisce la forza motrice per il trasporto di altre molecole tra cui: aminoacidi, zuccheri (glucosio) e fosfati [28, 29].

Nel 1932 Moravek e Kishi in una serie di pubblicazioni misero in evidenza l'alta presenza di K^+ all'interno della cellula non tumorale durante l'usuale attività fisiologica. Allo stesso tempo analizzarono anche il contenuto di K^+ nelle cellule neoplastiche (e non solo) appartenenti ad individui ammalati. I valori riportati sono:

- tessuto non tumorale 290 mg %
- tessuto neoplastico in via di sviluppo 50 mg %
- tessuto neoplastico altamente sviluppato 25 mg %
- tessuto neoplastico sviluppato in fase terminale 5 mg % - 0 mg %

Dall'analisi dei tessuti in esame si nota che il K^+ viene sostituito con il Na^+ . Gli studi di Moravek e Kishi si limitarono pertanto alla sola constatazione che nei tumori e principalmente nel sarcoma di Rous, il Na^+ sostituiva il K^+ [28].

2.6 OGGETTO DI STUDIO

Con questo studio, come già ampiamente descritto nell'introduzione, vogliamo caratterizzare diversi aspetti K:D-rib. Questo grazie all'utilizzo di diversi modelli di studio riconducibili ognuno ad un approccio di studio utilizzato. Si vuole studiare l'effetto che il composto ha sulla proliferazione di cellule tumorali (Hs-578T) e l'effetto che ha su cellule non tumorali (Hs-578bst).

Si vuole vedere come cambia il potenziale tumorigenico della linea cellulare tumorale e se la morfologia è alterata. Si analizzerà l'effetto protettivo del K:D-rib, correlabile al suo effetto antiossidante, sull'epitelio mammario non tumorale umano irraggiato in accordo con i protocolli terapeutici ed i dati riportati in letteratura circa le sedute di radioterapia convenzionali. Si investigherà inoltre se sarà presente un uptake di potassio grazie all'utilizzo del DNAzima come biosensore di ioni potassio, grazie a sequenze oligonucleotidiche di DNA ricche in guanina. Queste se foldate in presenza di ioni potassio hanno un'elevata affinità per l'emina, permettendo così la formazione della molecola di DNAzima.

2.6.1 K:D-rib e proliferazione cellulare

Lo studio della proliferazione cellulare è una tappa di fondamentale importanza per lo studio sia dell'effetto di xenobiotici su modelli cellulari che per lo studio del modello stesso. I molteplici metodi per saggiare la proliferazione cellulare o "hallmark", se si parla di proliferazione di cellule cancerose, hanno reso lo studio possibile sotto molteplici punti di vista.

Alcune delle tecniche più utilizzate per lo studio della proliferazione cellulare sono: la ricerca di marker specifici di proliferazione (es. Ki67), saggi di tipo metabolico (MTT, XTT, MTS, WST-1, produzione di ATP ecc), la citofluorimetria ed i saggi di proliferazione cellulare in vivo.

Quest'ultima categoria sfrutta animali da laboratorio, come ratti o topi, al fine di valutare in che modo con che tempi un tumore prolifera. La neoplasia può essere inoculata nell'animale (xenotrapianto) attraverso l'infusione di cellule tumorali coltivate in laboratorio oppure sviluppato dall'animale stesso, se geneticamente modificato. Con i saggi *in vivo* è possibile valutare oltre la proliferazione anche il potenziale invasivo-metastatico di una neoplasia ad un livello di complessità maggiore rispetto a quello che sarebbe possibile fare *in vitro*. Questo perché abbiamo architetture tissutali ed un microambiente tumorale che possono favorire oppure ostacolare la proliferazione e/o la progressione neoplastica, aspetto che *in vitro* è molto difficile ricreare. Questi esperimenti richiedono personale specializzato sia per la gestione che per il mantenimento degli stabulari, per tutte le operazioni condotte sugli animali, locali adeguati e fondi onerosi.

Ki67 è un marker specifico di proliferazione cellulare. Durante l'interfase, l'antigene Ki-67 può essere rilevato esclusivamente nel nucleo della cellula, mentre nella mitosi maggior parte della proteina si localizza sulla superficie dei cromosomi. La proteina è presente durante tutte le fasi attive del ciclo cellulare (G1, S, G2 e mitosi), ma è assente in cellule quiescenti (G0). Ampiamente utilizzato sia in diagnostica che in ricerca ci da un'indicazione chiara sullo stato proliferativo del campione che stiamo analizzando. Non ci dice in che fase del ciclo cellulare le cellule si trovano, ma ci dice solo se stanno proliferando oppure no [30].

La citofluorimetria a flusso è una metodica che permette di valutare alcuni parametri fisici, chimici di cellule contenute in una sospensione. Mediante l'uso di una luce laser e di appositi rilevatori ottici, il sistema raccoglie la fluorescenza emessa da un fluorocromo legato ad un anticorpo monoclonale specifico per i recettori di superficie e/o intracitoplasmatici delle cellule. Il segnale raccolto viene poi convertito in un segnale elettronico e graficato. La citofluorimetria è molto utilizzata per l'analisi del ciclo cellulare. Qui sono riportati quattro casi in cui è possibile utilizzare la citofluorimetria a flusso per lo studio del ciclo cellulare. I primi due si basano su l'analisi univariata del contenuto di DNA cellulare in seguito colorazione delle cellule con ioduro di propidio (PI) o 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Quest'approccio rivela la distribuzione delle cellule in tre fasi del ciclo (G1 vs S vs G2/M). Ci permette inoltre l'individuazione delle cellule apoptotiche grazie all'analisi della frammentazione del DNA. Il terzo approccio si basa sull'analisi bivariata di DNA contenuti e proteine di proliferazione associate quali ciclina D, ciclina E, ciclina A, o ciclina B1 vs contenuto di DNA. Quest'approccio permette di distinguere, per esempio, cellule in fase G0 da cellule in fase G1, identificare le cellule in mitosi, o ricerca dell'espressione di altre proteine capaci d'indicarci una fase del ciclo cellulare. Il quarto caso si basa sulla rilevazione di 5'-bromo-2'-deossipuridina (BrdU). Quest'ultima ci indica la quantità di cellule in divisione in quanto è utilizzata dalle cellule come analogo strutturale della timidina [31].

I test metabolici per saggiare la vitalità cellulare hanno guadagnato nel corso degli anni sempre più attenzione come alternativa possibile all'utilizzo di animali. Sono impiegati negli screening della citotossicità di un gran numero di prodotti chimici su diversi modelli cellulari, in chemioterapia per la selezione di farmaci anti-cancro e per determinare le dosi efficaci. I test per la vitalità cellulare sono validi sostituti and del test di captazione di $[H^3]$ timidina. Questo è un metodo conosciuto per la valutazione della proliferazione cellulare, ma richiede locali ed apparecchiature adatte e produce rifiuti radioattivi.

Il capostipite dei test metabolici impiegato per saggiare la vitalità cellulare è *MTT assay*. Questo test è basato sulla capacità che cellule vitali e metabolicamente attive possiedono di ridurre il bromuro di tetrazolio, sale giallo e solubile in acqua, ad un composto violaceo ed apolare chiamato formazan [32-34]; sono le reduttasi cellulari che catalizzano questa reazione. Il bromuro di tetrazolio è facilmente assorbito dalle cellule ed il formazan si accumula in granuli citoplasmatici in seguito eliminato tramite escitosi, che produce caratteristici aggregati aghiformi sulla superficie cellulare [35]. La produzione di formazan dovrebbe esser direttamente proporzionale alla quantità di cellule metabolicamente attive [32]. Il formazan viene quantificato spettrofotometricamente, solo dopo esser solubilizzato utilizzando solventi organici [36]. La conversione di bromuro di tetrazolio a formazan, compiuta dai mitocondri metabolicamente attivi, è stato utilizzato come test di

proliferazione cellulare e di citotossicità [37]. In realtà la riduzione non è solo associata ai mitocondri, ma anche con il citoplasma e con le membrane degli endosomi/lisosomi e la membrana plasmatica. La carica positiva netta di sali di tetrazolio come MTT e NBT sembra essere il fattore predominante coinvolto nel loro assorbimento cellulare tramite il potenziale di membrana plasmatica [38].

I Sali di Tetrazolio sono accettori di elettroni da parte di sostanze riducenti, o coenzimi tra cui NADH e NADPH, che possono tradurre la loro riduzione nella formazione di formazan. L'uso dell'MTT *assay* è basato sull'assunzione che questo colorante sia ridotto a formazan esclusivamente dal sistema della succinato deidrogenasi mitocondriale. Diversi autori mostrano come questo sia vero solo in parte e come sia necessario un uso critico del MTT *assay*, come del resto di tutti i test metabolici simili.

Chakrabarti *et al.*, osserva parte della formazione di formazan anche in alcuni, ma non in tutti, terreni di coltura in assenza di qualsiasi sistema vivente. Ciò indica che alcuni componenti del terreno di coltura potrebbero reagire con MTT riducendolo a formazan, come potrebbero fare le reduttasi mitocondriali. Ulteriori studi hanno rivelato che l'acido ascorbico può ridurre l'MTT a formazan. Il potenziale riduttivo dell'acido ascorbico è profondamente aumentato dalla presenza, seppur in quantità molto piccole, di retinolo; il solo retinolo non ha avuto effetto. Sembra quasi che il retinolo funga da catalizzatore (reduttasi) del bromuro di tetrazolio a formazan, utilizzando Vitamina C come riducente (antiossidante). Belyanskaya *et al.*, come altri autori analizzano hanno evidenziato che SWCNTs e altri materiali a base di carbonio interferiscono con coloranti su cui si basano i test di citotossicità, inclusi il bromuro di tetrazolio ed il 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolio (WST-1) [36]. A seguito degli studi citati si è deciso di valutare preliminarmente se il K:D-rib interagisse con il bromuro di tetrazolio. In accordo con il protocollo di *Franken* si è valutato anche il potenziale clonogenico della linea Hs 578T e come questo potesse cambiare in relazione al trattamento con K:D-rib. La capacità di generare colonie, per le cellule tumorale, è un aspetto piuttosto intrigante della proliferazione cellulare. Si misura la capacità di una singola cellula di generare una colonia, gruppo di cellula di almeno 50 unità.

Avendo a disposizione anche il modello cellulare non tumorale, linea cellulare Hs 578Bst, si è valutato se K.D-rib mostrasse qualche effetto. Lo studio è stato condotto utilizzando il numero di *split*; ancora una volta non si sono impiegati test metabolici per il motivo precedente.

2.6.2 Azione su capacità chemoinvasiva

L'azione chemoinvasiva, come descritto del paragrafo degli “*hallmarks*” è un aspetto fondamentale delle neoplasie. La malignità di un tumore la possiamo definire come capacità d'invadere i tessuti

circostanti, intravasare, extravasare e in seguito creare foci tumorali più o meno distanti dal sito di formazione del tumore primario, generando quindi metastasi. Negli ultimi vent'anni circa è nata l'esigenza di fornire ai ricercatori una possibilità di studio *in vitro* di diversi step o "hallmarks" che portano alla genesi della metastasi, dal tumore primario. Questo è stato possibile perché dal fenomeno "genesi neoplastica e metastatizzazione" si sono estrapolati i singoli aspetti e si sono potuti studiare individualmente.

Il processo d'invasione e metastatizzazione è molto complesso e processo che richiede ad una cellula tumorale di modulare la capacità di adesione, degradazione della matrice extracellulare circostante, migrazione e proliferazione in un distretto differente dal primario ed infine, i tumori devono anche stimolare l'angiogenesi e raggiungere dimensioni macroscopiche. Instabilità genetica favorisce l'acquisizione di una capacità di crescita incontrollata, la fuga dai meccanismi di controllo e molto spesso compare la resistenza ai trattamenti farmacologici. A parte l'evento trasformante iniziale, i fattori che entrano in gioco nel tumore sono clinicamente rilevanti. L'infiammazione è una caratteristica comune e potenzialmente chiave della maggior parte dei tumori, come la neo-vascularizzazione che permette un aumento delle dimensioni del tumore primario. In seguito ai segnali di mutazione/promozione neoplastica le cellule casualmente si staccano dal tumore primario e s'immettono attraverso il sangue o vasi linfatici. Questo è seguito dall'adesione all'endotelio ed il risultato finale è la penetrazione in un nuovo tessuto. Nel migliorare gli strumenti per effettuare questi studi/saggi, si è potuto inserire sempre più variabili, in modo tale da rendere sempre minore l'approssimazione del fenomeno e sempre più vicino a ciò che accade *in vivo*. Ci si è potuti spingere sempre più verso substrati di migrazione ed invasione simili alla matrice extracellulare e l'utilizzo delle cellule endoteliali ha permesso di saggiare quello che è effettivamente il potenziale maligno. Queste cellule hanno permesso di mimare *in vitro* ciò che potrebbe accadere durante il raggiungimento del sistema circolatorio e l'uscita da questo [39, 40].

Dei numerosi saggi di chemotassi attualmente disponibili, come migrazione cellulare attraverso supporti permeabili, rappresentano un scelta piuttosto popolare (ad esempio, la camera di *Boyden*). Oppure altri saggi permettono l'analisi del *cell crawling* mediante l'utilizzo di un coprioggetto (ad esempio, la camera di *Dunn*).

L'uso di agarosio come mezzo attraverso il quale le cellule possono diffondersi, mediante l'utilizzo di un chemoattrattore, ha fornito un sistema semplice e diretto per lo studio della motilità cellulare e del potenziale invasivo [40]. Questo saggio poco costoso e semplice da allestire ed ha permesso per la linea cellulare Hs-578T, carcinoma mammario umano, lo studio sia del potenziale invasivo che di quello migratorio. In un secondo momento ha permesso di verificare se queste due caratteristiche erano modificate dal trattamento con K:D-rib a diverse concentrazioni ed a tempi diversi.

2.6.3 Morfologia

La cellula maligna è caratterizzata da diversi cambiamenti biologici, se paragonata ad una cellula non tumorale. Tra questi compaiono anche cambiamenti morfologici. Talvolta alcune classificazioni istologiche partono dalla morfologia cellulare. Morfologicamente, la cellula cancerosa è caratterizzata da un rapporto nucleo/citoplasma diverso rispetto ad una cellula non tumorale. È presente un nucleo più grande, avente una dimensione e forma irregolare. I nucleoli sono prominenti, il citoplasma è scarso e intensamente colorato oppure è molto meno colorato. Talvolta il nucleo viene preso come marker morfologico di malignità. Cambiamenti nucleari spiegano la presenza di diversi cloni cellulari e anomalie genetiche associate con questi cambiamenti. Queste caratteristiche morfologiche riflettono i cambiamenti che si verificano a livello metabolico in una cellula tumorale. Il citoplasma subisce modificazioni con la comparsa di nuove strutture, come un accumulo di rRNA e di mRNA. Le cellule maligne hanno una piccola quantità citoplasmatica fortemente vacuolata. Il reticolo endoplasmatico rugoso ha un aspetto diverso rispetto a quello presente in cellule non tumorali. Amorfo, granuloso, ricco di materiale filamentoso può accumularsi in cisterne. Frammentazione e degranulazione si trovano di frequentemente, con l'interruzione del collegamento tra il reticolo endoplasmatico rugoso e mitocondri. La diminuzione del reticolo endoplasmatico rugoso e la sua modificazione strutturale durante la formazione neoplastica avviene in concomitanza con un aumento di ribosomi liberi e polisomi (ribosomi uniti assieme), che mostra una maggiore produzione di proteine necessarie per il processo di crescita cellulare. L'apparato di Golgi nelle cellule maligne è generalmente poco sviluppato, il che comporta una correlazione con la mancanza di differenziazione delle cellule tumorali. Le cellule che hanno perso differenziazione, presentano solo occasionalmente l'apparato di Golgi. I mitocondri, durante il processo neoplastico, diminuiscono di dimensioni mostrando un'elevata variabilità di forma e volume. La distribuzione longitudinale dei mitocondri comporta un'insufficiente citocromo ossidasi.

Microfilamenti, filamenti intermedi e microtubuli appaiono in quantità diverse in cellule maligne. La capacità d'invasione e metastasi della cellula cancerosa, dipende dal potenziale migratorio correlato al contenuto actina. Carcinomi epiteliali contengono citocheratine, tumori mesenchimali contengono vimentina, e nelle cellule del sistema nervoso centrale è una proteina acida da fibre gliali, con un ruolo particolare nella diagnosi dei tumori. Agenti citostatici agiscono sulla depolimerizzazione dei microtubuli cellulari tumorali che culminano con l'inibizione della metastatizzazione, mitosi e la crescita tumorale. La membrana cellulare svolge un ruolo molto importante nel processo neoplastico. Cambiamenti molecolari superficiali sono in grado d'influenzare l'evoluzione maligna. Un aumento o diminuzione del numero di recettori di superficie

possono interferire con i meccanismi di regolazione. Mutazioni strutturali di proteine o recettori di superficie possono interagire maggiormente più con il ligando oppure lo stesso effetto lo si può avere se è il ligando ad esser mutato. Le cellule maligne cambiano il loro contenuto di enzimi, quali la riduzione della fosfatasi acida o alcalina. Si verificano cambiamenti nel rapporto tra zuccheri e l'acido sialico da glicolipidi e glicoproteine, ed una depolarizzazione della membrana. La membrana plasmatica della cellula maligna favorisce il trasporto accelerato di sostanze nutritive, in particolare zuccheri e amminoacidi. La superficie di cellule maligne mostra antigeni di differenziazione che esprimono un normale sviluppo della cellula cancerosa e antigeni specifici per il tumore, che appaiono con la trasformazione neoplastica, dalla variazione del programma genetico della cellula. Sulla superficie cellulare vi sono proteasi di superficie specifiche responsabili della capacità litica e che possono conferire un aumento della migrazione. Perdendo l'inibizione da contatto, le cellule tumorali acquisiscono anche l'autonomia metabolica, sia la loro proliferazione e il movimento di essere favorita. Sulla superficie delle cellule maligne possiamo trovare una concentrazione ed una morfologia atipica dei microvilli, pseudopodi e strutture che possono favorire la migrazione cellulare. Un tipo istologico specifico di carcinoma a cellule squamose è il carcinoma a cellule fusiformi. È indicato anche come pseudosarcoma o carcinosarcoma. Le cellule fusiformi sono sottili, allungate ed infiltrano il tessuto stromale. Si possono trovare sia come singole cellule, come cordoni di cellule piuttosto che come gruppi o isole. Carcinoma a cellule fusiformi è stato trovato in molti tipi di cancro diversi ed è associato ad una brutta prognosi nei tumori della cavità orale, esofago e polmone. Cellule neoplastiche epiteliali fusiformi hanno perso le loro caratteristiche tipiche epiteliali e sembrano acquisire la capacità di infiltrarsi nello stroma sottostante e metastatizzare [41].

In accordo con ciò che è stato qui riportato, con questo studio si è scelto di analizzare la morfologia delle cellule di carcinoma mammario umano (Hs-578T) prima e dopo il trattamento con K:D-rib, valutando se vi fossero cambiamenti morfologici in accordo con i cambiamenti di proliferazione cellulare e potenziale invasivo. La morfologia cellulare è stata studiata tramite la microscopia a forza atomica (AFM). Inoltre si è voluto verificare se il trattamento potesse indurre la formazione di strutture necessarie alla cellula per una maggior adesione al substrato oppure se il trattamento interferisse con la formazione di queste strutture.

2.6.4 Potere protettivo ed azione antiossidante

Un aspetto da considerare riguardante il K:D-rib è il potere antiossidante. Questo lo si potrebbe pensare in termini protettivi contro lo stress ossidativo che è alla base di molte patologie, sindromi, terapie ed in parte derivante anche dal metabolismo cellulare. Uno studio precedente a questo ha

dimostrato il forte effetto antiossidante di ascorbato di potassio (KAsc) sull'ossidazione dei globuli rossi. In questo studio s'induceva un forte stress ossidativo in globuli rossi. Si è visto che trattando gli eritrociti con un forte ossidante acetilfenilidrazina (APH) ed incubandolo con KAsc, l'effetto del potente ossidante era significativamente ridotto. Sembra che l'acido ascorbico, interagendo con il KHCO_3 , traghetti il K^+ all'interno degli eritrociti [42].

Uno studio condotto su bambini affetti dalla sindrome di Costello, se trattati con PAR (D-ribosio, bicarbonato di potassio ed acido ascorbico) mostrano un miglioramento delle loro condizioni, già anche dopo una somministrazione di PAR, come fosse un integratore vitaminico. Un follow-up impostato secondo un programma di gestione della sindrome Costello, ha mostrato un netto miglioramento del quadro clinico del paziente. C'è stato un miglioramento della pelle, una migliore evoluzione psicomotoria, arresto di progressione dell'ipertrofia cardiaca e nessun sviluppo di neoplasie; essendo la sindrome di Costello una sindrome ad alto sviluppo oncologico. Gli autori ipotizzano un effetto protettivo contro lo stress ossidativo, essendo PAR un antiossidante. Si sono confrontati i valori di biomarcatori dello stress ossidativo trovati dopo la somministrazione PAR con un campione non trattato ed è stata vista una riduzione dei biomarcatori dello stress ossidativo, anche per pazienti con sindromi ad alto rischio oncologico come la sindrome di Beckwith-Wiedemann [43]. In un altro studio condotto su una paziente con sindrome di Prader Willi, sono emersi effetti positivi dovuti al trattamento con PAR. Sembra dare effetti davvero molto promettenti, sotto l'aspetto clinico. C'è anche in questo caso una riduzione dello stress ossidativo con la mancata obesità, aspetto che contraddistingue questi pazienti [44].

Recentemente sono stati pubblicati dati in cui, tramite spettroscopia UV/VIS, si dimostra l'interazione tra il bromuro di tetrazolio ed il K:D-rib, anche a basse concentrazioni. Il K:D-rib mostra un comportamento analogo all'acido ascorbico ed al KAsc. Spontaneamente l'acido ascorbico riduce il bromuro di tetrazolio a formazan quanto riduce molti composti così come H_2O_2 e Citocromo *c* [34]. Per analogia, possiamo affermare che il K:D-rib mostra un potere antiossidante e come tale potrebbe espletare un effetto protettivo nei confronti di stress ossidativi [1, 34].

Queste evidenze sperimentali ci hanno indotto a valutare l'effetto protettivo del K:D-rib nei confronti della linea cellulare Hs-578Bst (epitelio mammario umano non tumorale) irraggiata con due dosi da 2Gy di raggi-X, mimando una seduta di radioterapia convenzionale. Le radiazioni ionizzanti agiscono inducendo stress ossidativi diretti verso i target biologici quali le cellule tumorali. La ionizzazione può avvenire direttamente sul target biologico, oppure indirettamente generando radicali liberi attraverso la ionizzazione di molecole radiosensibili quali acqua ed ossigeno. Vogliamo valutare l'effetto protettivo del K:D-rib nei confronti della porzione di tessuto stromale circostante la massa tumorale irradiata. Ci concentreremo sul danno perossidico alla

membrana cellulare ed alle porzioni citoscheletriche direttamente connesse con essa. L'analisi del danno verrà condotta analizzando la morfologia tramite AFM.

2.6.5 Uptake K:D-rib

Un quesito che ci si è posto è se vi fosse in un qualche modo un *uptake* del K:D-rib; più precisamente *uptake* dello ione potassio. Per rispondere a questa domanda si è utilizzato il DNAzima come biosensore di ioni potassio. Il DNAzima è un enzima a DNA, e come tale è in grado di catalizzare le reazioni chimiche grazie alla sua attività perossidasi. Questo è formato da emina e G-quadruplex. L'emina, con l'atomo di Fe, costituisce la parte catalitica della molecola ed il G-quadruplex che costituisce l'apoenzima [45-47]. Alcuni aptameri (acidi nucleici artificiali) sono noti per avere motivi G-quadruplex che possono legare l'emina. Tra questi compaiono PS5.2M e PS2.M [47]. Altri G-quadruplex non sintetici, thrombin binding aptamer (TA, 15-mer), AGRO 100 e le sequenze telomeriche umane, è stato dimostrato abbiano un'intrinseca debole attività perossidasi. Si è recentemente osservato che alcuni motivi a G-quadruplex sono presenti in sequenze promotrici e possono complessare l'emina formando DNAzima. Il DNAzima, dal punto di vista catalitico, come descritto prima, è una perossidasi. È in grado di catalizzare l'ossidazione del 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) grazie alla presenza di H₂O₂, ad ABTS⁺ ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$, $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Confrontato con le proteine tradizionali, il DNAzima mostra diversi vantaggi: stabilità chimica, basso costo, sintesi relativamente semplice e di facile modificazione [48].

Il G-quadruplex è stato foldato in presenza di ioni potassio derivanti dal surnatante delle cellule tumorali trattate e non trattate. In questo modo l'apoenzima ha un'affinità molto alta per l'emina garantendo la formazione del DNAzima, rilevabile attraverso spettroscopia UV-VIS. Al momento si sta cercando di utilizzare i soli G-quadruplex come biosensori di potassio, in quanto la parte del DNAzima che realmente interagisce con il potassio sono le sequenze oligonucleotidiche. Queste conformazioni possono essere studiate seguendone il folding tramite spettroscopia CD. Il G-quadruplex sembra esser un sistema altrettanto interessante come biosensore, ma ha il vantaggio d'esser più semplice rispetto al DNAzima perché non ha l'emina.

2 STATO DELL'ARTE

2.1 DEFINIRE IL CANCRO

Sul sito [dell'american Cancer Society](#) alla domanda "What is cancer?" si legge la seguente risposta "*Cancer is the general name for a group of more than 100 diseases. Although there are many kinds of cancer, all cancers start because abnormal cells grow out of control. Untreated cancers can cause serious illness and death*".

Dal sito [dell'agenzia italiana per la ricerca sul cancro AIRC](#) alla parola cancro si trova la seguente definizione "non si può parlare di un'unica malattia chiamata cancro, ma di diversi tipi di malattie, che hanno cause diverse e distinte, che colpiscono organi e tessuti differenti, che richiedono quindi esami diagnostici e soluzioni terapeutiche particolari. Esistono però alcune proprietà che accomunano tutti i tumori, e che consentono di tentare una risposta valida un po' per tutte le forme della malattia. Per usare una metafora, si può dire che ad un certo punto, una cellula dell'organismo "impazzisce" - perde alcune sue proprietà, ne acquisisce altre - e comincia a moltiplicarsi al di fuori di ogni regola".

Entrambe le definizioni collimano sulla multifattorialità della patologia e sul fatto che cellule di un organismo sano, possono "impazzire" ed iniziare una vita biologica assolutamente al di fuori e non curanti delle "regole" imposte e dettate dal tessuto nel quale si trovano. Questa visione un po' letterale del tumore, ha però comprovati fondamenti scientifici.

Storicamente il cancro si potrebbe pensare esser una patologia legata al progresso ed allo sviluppo, ma la sua nascita precede di molto l'inizio dell'era scientifico-tecnologica. Solo l'incidenza della malattia è aumentata negli ultimi anni, ma la patologia è comparsa molto tempo prima. Sono arrivati fino a noi reperti fossili che mostrano come neoplasie fossero già presenti in arti di animali preistorici [1].

Il cancro, come si evince dalle due definizioni, è definito come una malattia multifattoriale. Diversi sono gli aspetti coinvolti e soprattutto diversi sono i fattori di rischio che possono favorire l'insorgere della malattia. Ci sono evidenti correlazioni fra l'obesità, il diabete di tipo due e lo sviluppo di carcinomi. Lo stile di vita come la scarsa attività fisica ed uno stile alimentare sregolato, aumentano i fattori di rischio. Fattori biologici quali l'obesità addominale, stati infiammatori, dislipidemia, iperglicemia ed alterati livelli di adipochine, possono favorire l'insorgenza di tumori. Studi *in vitro* ed *in vivo*, hanno mostrato il contributo potenziale di questi fattori circa lo sviluppo di tumori [2].

Sebbene numerosi studi epidemiologici hanno indagato i fattori di rischio oncologico, molto meno studiati sono stati gli aspetti demografici, lo stile di vita, la componente ereditaria, i fattori clinici e

sociali. Altrettanto poco studiate sono state le interazioni tra questi fattori che possono influenzare i risultati relativi alle neoplasie in termini diagnostici e prognostici. In letteratura gli studi circa la sopravvivenza al cancro, con riferimento alla qualità della vita, sono state le aree di ricerca più investigate con il 62% di studi. Negli ultimi anni, tuttavia, vi è stato un aumento di sforzi concentrati sui fattori molecolari, genetici, e predittivi che influenzano le recidive neoplastiche [3].

L'organizzazione Mondiale della Sanità OMS ha sviluppato tre principi circa la prevenzione del cancro:

1. le correnti strategie di prevenzione potrebbero interessare fino ad un terzo dei nuovi casi di tumore
2. il miglioramento degli screening diagnostici di neoplasie in fasi precoci dello sviluppo tumorale potrebbero portare a scoprire un terzo dei tumori con un guadagno nella sopravvivenza del paziente
3. una strategia globale di trattamento potrebbe migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita per un altro terzo dei pazienti con tumore ad uno stadio avanzato [4].

2.1.1 Approcci di studio e terapie tradizionali

Il cancro è ancora una delle maggiori cause di morte nonostante anni di studi e fondi impiegati per risolvere il problema, volti alla ricerca d'approcci terapeutici idonei alla complessità della malattia. I biologi hanno trascorso decenni a caccia di una "cura" inafferrabile per il cancro, tutto basato sul presupposto che i geni sono al centro della malattia. Analizzare e studiare queste mutazioni, dovrebbe portare al disegno di potenti terapie che possano "correggere" queste mutazioni assolvendo così al meccanismo biologico mutato. Ma nonostante le somme enormi impiegate ed il tempo trascorso nel ricercare la cura ideale contro il cancro, il tasso di mortalità per tumore nei soli Stati Uniti dal 1950 è sceso appena dell'11% [5].

L'introduzione di terapie mirate per i meccanismi delle patologie tumorali è uno dei frutti di tre decenni di notevoli progressi della ricerca sui meccanismi di patogenesi del cancro [6]. Progressi senza precedenti nella capacità di sequenziamento dei genomi, misurare l'espressione di geni codificanti e non codificanti per RNA, l'analisi epigenetica, ed i profili di proteomica e metabolomica su larga scala stanno avendo un grande potere sulla direzione della ricerca e sulla visione di come i malati di cancro dovrebbero essere trattati. Lo scopo di queste tecnologie sarebbe dare la possibilità di un'analisi personalizzata dei tumori per contribuire a definire ed identificare biomarcatori. Questi che potrebbero permettere una terapia basata sulla comprensione delle vie che operano in ogni singola neoplasia, piuttosto che trattare tutti i tumori allo stesso modo [4].

La crescente comprensione di gran parte dei meccanismi molecolari responsabili delle trasformazioni neoplastiche e della progressione ha spinto la ricerca di nuovi farmaci che

potrebbero interferire con i bersagli intracellulari coinvolti in questo processo. Farmaci che hanno come targets specifici molecole, ad esempio il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), vengono utilizzati sempre più per trattare il cancro. In questo momento, i medici stanno combinando radioterapia e trattamenti farmacologici, come inibitori di checkpoint e molecole bersagli della trasduzione del segnale e del microambiente tumorale. Inoltre, si sta esplorando la possibilità di combattere patogeni, quali il virus di Epstein-Barr e le oncoproteine virali codificate dall'ospite per il virus stesso, per migliorare l'efficacia della radioterapia nei pazienti. Grazie al rapido sviluppo di metodi d'imaging molecolare diretti verso recettori, enzimi, apoptosi, angiogenesi e vascolarizzazione tumorale, la diagnostica per immagini sta diventando un potente strumento per comprendere lo sviluppo e progressione del cancro. Il miglioramento delle tecniche d'imaging è d'aiuto sia nello sviluppo di farmaci antitumorali che nella valutazione degli effetti terapeutici nei pazienti [4].

Un'attenzione sul rapporto tra infezione e cancro, al fine di designare sempre più importanti strategie terapeutiche. Circa 200.000 donne muoiono ogni anno da carcinoma della cervice, che è strettamente associato con papillomavirus umano (HPV). L'infezione da *Helicobacter pylori* invece è collegata a gastromicosi, che è la fase precancerosa del carcinoma gastrico di tipo tre.

Studi eseguiti per affrontare i meccanismi molecolari di carcinogenesi, combinando i dati epidemiologici ed i risultati *in vitro*, hanno portato ad un improtante aumento del bagaglio conoscitivo relativo al cancro. Ad esempio lo studio dei cambiamenti epigenetici durante la carcinogenesi sta rapidamente diventando un importante campo di studio. Il silenziamento epigenetico mediante la metilazione dell'isola CpG (CIMP), incarna una nuova prospettiva nella diagnosi e nella terapia del cancro. L'interazione dinamica tra le modificazioni epigenetiche e posttraduzionali tra cui fosforilazione, acetilazione ed ubiquitinazione, concorrono alla complessa regolazione della carcinogenesi. RNA non codificanti, come micro RNA, sono coinvolti nella carcinogenesi [7-9]. Il ruolo della medicina traslazionale è molto importante e riguarda il passaggio dal concetto alla pratica visto anche come il passaggio dal bancone del laboratorio al letto del paziente. La medicina traslazionale ha permesso d'acquisire sempre più conoscenze circa i tre più comuni problemi del cancro: la diagnosi, la terapia e guarigione [4].

Come riportato in figura 2.1 sembrerebbe che se un farmaco è mirato verso un particolare processo, allora la sua inibizione dovrebbe compromettere la crescita e la progressione tumorale. Com'è evidente dalla figura 2.1 il disegno delle terapie convenzionali sembrerebbe diretto verso un particolare target metabolico – molecolare che permetterebbe al tumore di acquisire una specifica caratteristica, chiamata anche “hallmarks”.

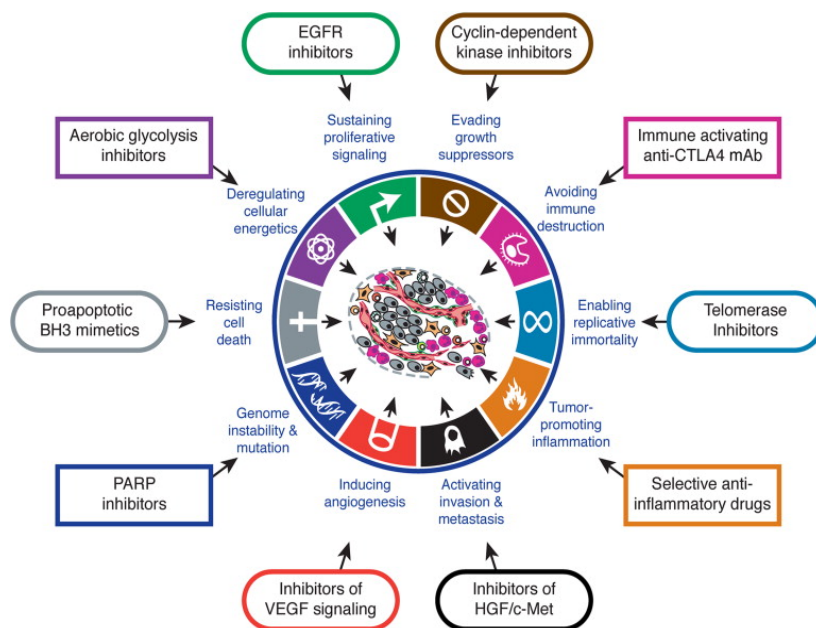


Figura 2.1: Farmaci che interferiscono con “hallmarks” delle funzionalità acquisite necessarie per la crescita e la progressione tumorale. Questi farmaci sono stati sviluppati e sono stati approvati in studi clinici per il trattamento di alcune forme di cancro.

In accordo con questa logica, il farmaco dovrebbe bloccare la formazione e/o la progressione tumorale. Tale specificità d’azione è stata considerata una virtù, in quanto presentava attività inibitoria contro un obiettivo pur avendo, in linea di principio, relativamente meno effetti collaterali e quindi meno tossicità aspecifica. Nonostante quest’elegante e logica assunzione i successi clinici sono generalmente temporanei e seguiti da recidive quasi inevitabili.

Un’interpretazione, sostenuta da un crescente numero di dati sperimentali, è che ciascuno degli “Hallmarks” neoplastici è regolato da vie di segnalazione parzialmente ridondanti. Di conseguenza, un agente terapeutico mirato inibendo una via chiave in un tumore non può completamente spegnere un “Hallmarks”, permettendo così ad alcune cellule tumorali di sopravvivere con la possibilità che la loro progenie possa eventualmente adattarsi alla pressione selettiva imposta dalla terapia. Tale adeguamento può essere realizzato da: una mutazione, una riprogrammazione epigenetica o un rimodellamento del microambiente stromale. Questo sarà in grado di ristabilire la capacità funzionale, permettendo una crescita tumorale rinnovata. Siccome il numero di vie di segnalazione parallele supportanti un “hallmarks” deve essere limitato, potrebbe diventare possibile indirizzare una terapia verso tutti questi percorsi, impedendo così l’adattamento della patologia alla terapia.

In risposta al trattamento le cellule tumorali possono silenziare un “*hallmarks*” mostrandone però altri, il che rappresenta un esempio di farmacoresistenza acquisita in seguito al trattamento farmacologico. Questo concetto è esemplificato dalle recenti scoperte relative alle risposte di alcuni tumori a terapie antiangiogenetiche. Alcuni studi prevedevano che l'inibizione efficace dell'angiogenesi renderebbe i tumori dormienti e potrebbe portare anche alla loro progressiva distruzione [10]. Nonostante questo le risposte cliniche alle terapie antiangiogenetiche sono state trovate esser transitorie. In alcuni modelli preclinici, dove neoplasie erano trattate con potenti inibitori dell'angiogenesi, vi era un'interferenza con l'attività angiogenica ma negli stessi modelli invasività e metastatizzazione erano significativamente aumentate [11-13]. Invadendo i tessuti vicini, le cellule tumorali inizialmente non sono in grado di costruire una rete vascolare ma accedono al preesistente sistema vascolare. Questo è stato visto in glioblastomi trattati con farmaci antiangiogenetici [14-16].

Ad esempio farmaci pro apoptotici possono indurre nelle cellule tumorali un aumento dei segnali mitogeni, consentendo così di compensare l'effetto iniziale innescato da tali trattamenti. Queste considerazioni suggeriscono che lo sviluppo di farmaci e la progettazione di protocolli terapeutici dovranno esser integrati con le informazioni relative ai pathways che supportano questi processi [6].

2.1.2 Approcci di studio non genetici al problema cancro

Piuttosto che vedere il cancro solamente in termini di mutazioni genetiche, alcuni fisici stanno esaminando parametri peculiari della patologia tra cui: modalità di crescita cellulari, polarizzazione e depolarizzazione delle cellule cancerose e come alcune cellule evolvono e diffondono in tutto il corpo [5].

Nel 1970 Clarence Cone, biofisico al NASA's Langley Research Center in Virginia notò che le cellule tumorali erano meno polarizzate di quelle non tumorali. Cone suggerì che la polarizzazione delle cellule poteva portare ad una regolazione della proliferazione cellulare.

40 anni dopo Michel Levin e Brook Chernet modificando geneticamente dei girini mediante mRNA oncogenici, confermarono le assunzioni di Cone. Immergendo le larve in coloranti fluorescenti sensibili al voltaggio, valutarono la differenza di polarizzazione delle cellule costituenti le larve. Levin e Chernet non sapevano quali girini avessero sviluppato tumori. Non appena un girino esibì una macchia scura indicando un abbassamento della polarizzazione delle cellule, i ricercatori isolarono queste larve dalle altre per monitorarle. Essi scoprirono che le macchie scure indice di una depolarizzazione, erano quasi sempre presenti in regioni tumorali confermando così il legame tra la polarizzazione delle cellule e cancro [17].

Secondo Mina Bissel, Biologa irano - americana per il tumore è estremamente importante il suo microambiente. Le modificazioni della matrice extracellulare determinano in misura molto fine se una cellula potrebbe diventare cancerosa oppure no [18].

Tramite analisi di microscopia a forza atomica (AFM) si sta investigando il perchè le cellule tumorali sono strutturalmente più morbide rispetto alle cellule non tumorali, nonostante le masse cancerose siano piuttosto dure. Questo aspetto apparentemente paradossale, potrebbe assumere anche valore di tipo prognostico-predittivo su quale potrebbe essere l'evoluzione delle cellule tumorali [5, 19].

Tecniche biofisiche rivelano che le cellule tumorali coltivate sono più deformabili rispetto alle loro controparti non tumorali. Quest'aumento d'elasticità e/o deformabilità è accompagnato da alterazioni nella struttura citoscheletrica ormai note esser associate ad un aumento della malignità [20, 21].

Altri ricercatori sono impegnati nell'analizzare se la proliferazione delle cellule tumorali può essere impedita manipolando la loro polarizzazione. Un altro aspetto emerso tramite microscopia confocale, è la rotazione delle cellule di tumore mammario. Secondo alcuni scienziati quest'aspetto potrebbe contenere indizi di tipo prognostico relativi alla patologia tumorale [5].

2.1.3 ricerca di hallmarks

Con il termine “*hallmarks*” s’intendono quelle caratteristiche acquisite dalle cellule durante la trasformazione neoplastica. Gli “*hallmarks*” sono importanti perché ci forniscono parametri per comprendere la formazione e la progressione tumorale come riportato da *Hanahan et al.*, (Hanahan and Weinberg, 2011). Gli “*hallmarks*” fino al 2000 erano sei: **segnali di attiva proliferazione cellulare, elusione dei segnali di soppressione tumorale, resistenza alla morte cellulare, immortalità cellulare, induzione di angiogenesi** ed infine **malignità** (invasione e metastasi) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dal 2000 in poi c’è stato il tentativo da parte di più scienziati di individuarne di altri, pertanto attualmente l’analisi e la classificazione è diventata via via più complessa. Ne sono stati proposti altri che includono l’elusione del controllo del sistema immunitario (Hanahan and Weinberg, 2011; Negrini et al., 2010) ed altre cinque caratteristiche relative alla presenza di stress nel cancro: il danno al DNA e la replicazione del DNA, lo stress ossidativo, lo stress mitotico, lo stress proteotossico (accumulo di proteine non correttamente foldate) e lo stress metabolico (Luo et al., 2009; Negrini et al., 2010). Questi nuovi *hallmarks* sono qualitativamente differenti rispetto ai primi in quanto non descrivono le capacità funzionali di tumori ma piuttosto lo stato delle cellule tumorali, caratterizzato dalla presenza dei vari stress.

In accordo con l’analisi di Hanhan accanto ai primi sei *hallmarks* se ne possono collocare altre quattro quali: **i cambiamenti metabolici nel tumore, l’elusione da parte della patologia della sorveglianza del sistema immunitario, l’instabilità genomica e l’infiammazione promotrice del tumore** 2.1.

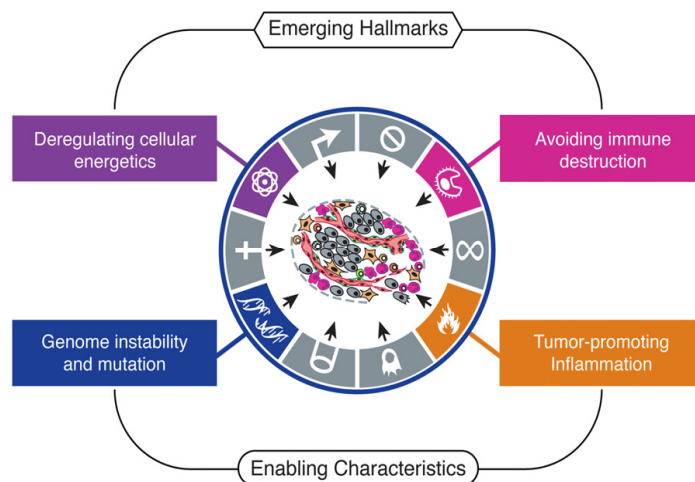


Figura 2.1: Hallmarks Emergenti Un numero crescente di ricerche suggerisce il coinvolgimento di due caratteristiche addizionali o nuovi “hallmarks” neoplastici, nella patogenesi tumorale. Il primo riguarda la possibilità di modificare o riprogrammare il metabolismo cellulare al fine di sostenere la proliferazione neoplastica. Il secondo permette alle cellule tumorali di eludere il controllo del sistema immunitario, in particolare dai linfociti T e B, macrofagi e cellule natural killer. Altre due caratteristiche facilitano l’acquisizione delle due descritte in precedenza: l’instabilità genomica e l’infiammazione connessa alla neoplasia. L’instabilità genomica connessa con la possibilità che le cellule tumorali hanno di mutare, possono esser indispensabili per il tumore.

2.1.3.1 Attiva proliferazione tumorale.

Nei tessuti non tumorali vi è un rilascio controllato di fattori di crescita che promuovono e coordinano, attraverso la proliferazione cellulare e l'apoptosi, l'architettura e l'omeostasi tissutale. Le cellule cancerose non hanno questi meccanismi così controllati e finemente regolati, perciò diventando loro stesse "i maestri del loro destino biologico" (Hanahan and Weinberg, 2011). L'acquisizione di una funzione, in questo caso una maggior capacità proliferativa, è legata al concetto di oncogene. Un oncogene è un gene con una mutazione che garantisce un'acquisizione di funzione e come tale si manifesta. Le cellule tumorali possono acquisire un'intensa capacità proliferativa in diversi modi: producendo loro stesse fattori di crescita oppure tramite l'espressione di recettori per fattori di crescita; stimolazione proliferativa autocrina. Oppure le cellule tumorali possono inviare segnali alle cellule non tumorali, costituenti lo stroma associato al tumore, che a loro volta inviano fattori di crescita alle cellule tumorali. Un'elevata espressione di recettori per fattori di crescita può portare ad un'elevata proliferazione cellulare, nonostante la sintesi di fattori di crescita sia fisiologica.

Lo stesso effetto lo si può avere nel caso in cui sia l'espressione dei recettori che la sintesi di ligando sia fisiologica, ma quest'ultimo è mutato. In questo caso il ligando non riuscendo a staccarsi dal recettore secondo tempi fisiologici, porta la cellula ad una proliferazione continua.

La proliferazione cronica delle cellule tumorali potrebbe arrivare anche a valle dell'interazione ligando – recettore. Ad esempio se abbiamo un trasduttore del segnale mutato come RAS, abbiamo un'attivazione costitutiva della proliferazione cellulare senza necessariamente avere mutazioni a monte. Recenti studi hanno evidenziato l'importanza di feedback negativi, ovvero controlli che normalmente operano nel silenziare i vari tipi di segnale ed assicurare in tal modo l'omeostasi della proliferazione .

Il prototipo di questa regolazione è Ras. Se RAS presenta una mutazione funzionale relativa all'attività GTPasica, non può più comportarsi come un regolatore negativo per la via di trasduzione del segnale. Isoforme mutate nella subunità catalitica della PI3-chinasi sono state trovate in una vasta gamma di tumori. Queste mantengono sempre attivo il pathway di segnalazione della PI3-chinasi. Un altro regolatore negativo coinvolge la fosfatasi PTEN che degrada PIP3 (fosfatidil inositolo trifosfato), prodotto della PI3 chinasi. La mutazione per perdita di funzione di PTEN amplifica il signaling di PIK3 promuovendo la tumorigenesi in molti modelli di studio neoplastici. Nei tumori umani è stato trovato il promotore di PTEN metilato e la sua espressione è downregolata.

Il 40% dei melanomi umani contengono mutazioni in B-Raf, con conseguente segnalazione costitutiva, attraverso Raf, della *mitogen activated protein* (MAP) - chinasi (Hanahan and Weinberg, 2011).

Una collocazione in questo paragrafo la trovano anche i canali potassio come dimostrano gli studi condotti da De Coursey e collaboratori nel 1984 su linfociti e da Day nel 1993 su embrioni.

Una panoramica del ruolo generale esercitata dai canali K^+ sulla progressione del ciclo cellulare è fornita da Ouadid-Ahidouch e Ahidouch nel 2013. Mentre lo studio dei canali voltaggio-dipendenti Kv1.3 e KV1.5 nel cancro umano è riesaminata da Arriva e collaboratori in un lavoro del 2013. Un gruppo di canali K^+ voltaggio-dipendenti sembrano esser coinvolti nella cancerogenesi e comprendono KV10 o Eag ed il KV11 o Erg. È stato dimostrato che l'espressione di superficie del canale KV10.1 oncogeno è regolata dalla proteina Golgi residente PIST (noto anche come GOPC), da una interazione mediata dal dominio PDZ (Becchetti et al., 2013). Da questo momento in poi una grande varietà di canali K^+ sono stati trovati essere implicati nella regolazione della proliferazione di carcinoma prostatico, del colon, del collo e tumore della testa, linfoma e cellule di epatocarcinoma. Questi dati si basano sul fatto che, *in vitro*, inibizione genetica o farmacologica di canali K^+ blocca la crescita di cellule tumorali. Anche l'apertura del canale K^+ può essere responsabile di un aumento del tasso di proliferazione cellulare. Uno dei modelli più accreditati si basa sul coinvolgimento dei canali K^+ nella regolazione del potenziale di membrana, che spinge le cellule tumorali in alcune fasi del ciclo cellulare. È stato dimostrato che le cellule nella fase G1 precoce sono depolarizzate, ma sono iperpolarizzate durante la progressione del ciclo attraverso la fase G1 e nella fase S. L'inibizione dei canali K^+ o il blocco delle cellule in fase G1 per deplezione da siero è accompagnato da depolarizzazione della membrana. Analogamente la depolarizzazione della membrana causata da un aumento della concentrazione di K^+ extracellulare mima gli effetti dei bloccanti dei canali K^+ . I meccanismi che consentono ai canali K^+ di regolare la crescita cellulare in linee cellulari tumorali sembrano essere diversi da quelli in cellule normali. È stato riportato che le cellule tumorali esprimono diverse isoforme dei canali K^+ che possono essere fisiologicamente differenti rispetto ad un canale *wild type* (Ouadid-Ahidouch and Ahidouch, 2013). Un legame fra ione potassio e proliferazione cellulare è fornito dai G-quadruplex. Questi sono strutture terziarie di sequenze di acidi nucleici ricche in guanina. Tali strutture sono generate attraverso legami idrogeno (appaiamento di *Hoogstein*) tra quattro guanine, che formano la cosiddetta tetrade. Queste sono stabilizzate attraverso la presenza di un catione monovalente che si dispone al centro della tetrade stessa. Diversi sono i cationi che possono intervenire nel folding di queste strutture, ma lo ione che presenta affinità maggiore è lo ione potassio (Parkinson et al., 2002; Xu et al., 2006).

Il link fra i G-quadruplex e la proliferazione cellulare emerge analizzando parte delle sequenze promotrici di alcuni oncogeni. Infatti sequenze di DNA ricche in guanine si trovano in regioni promotrici di una serie di regolatori trascrizionale (Dai et al., 2006). La stabilizzazione ed il folding dei G-quadruplex può ostacolare direttamente la progressione del ciclo cellulare: il DNA deve essere srotolato per la progressione della fase S ed anche per tante altre funzioni. Di conseguenza la stabilizzazione potrebbe metter in stallo la cellula tumorale e fermare la progressione della fase S. Diversi ligandi di G-quadruplex hanno dimostrato diminuire l'espressione di alcuni oncogeni. In teoria, l'espressione degli oncogeni associati a tutti e sei gli *hallmarks* possono essere bloccate promuovendo il folding dei G-quadruplex delle sequenze ricche in guanina presenti nelle sequenze promotrici (Hampel et al., 2013).

2.1.3.2 elusione dei segnali di soppressione della crescita tumorale

Le cellule tumorali mostrano abilità nell'eludere l'azione delle proteine codificate dai geni soppressori del tumore, o geni che regolano negativamente la proliferazione cellulare. Moltissimi oncosoppressori sono stati trovati mutati nella stragrande maggioranza dei tumori. I paradigmi degli oncosoppressori tumorali sono TP53 ed RB *associated protein*. Le attività di queste due proteine sono direttamente connesse con l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione di eventi apoptotici. TP53 ed RB *associated protein* rivestono ruoli chiave nella regolazione del ciclo cellulare.

RB *associated protein* coordina il signaling cellulare che parte dall'ambiente extracellulare. Cellule deficitarie di RB *associated protein*, mancano di un regolatore chiave del ciclo cellulare e questo potrebbe portare ad una proliferazione incontrollata. TP53, a differenza di RB *associated protein*, riceve segnali dall'ambiente intracellulare. Gli *input* derivano da situazioni di stress quali: mutazioni geniche o genomiche, stress nutrizionali, stress relativi alla scarsità di ossigeno o carenza di fattori di crescita. TP53 può bloccare il ciclo cellulare fino a quando le condizioni non sono ritornate compatibili con la progressione del ciclo cellulare. TP53 potrebbe promuovere eventi apoptotici nel caso in cui la cellula o non ripara i danni oppure le condizioni sfavorevoli permangono. TP53 e RB *associated protein* hanno un'importanza primaria nella regolazione della proliferazione cellulare ma entrambe sono parte integrante di una più ampia rete di *signaling* cellulare.

2.1.3.3 Resistenza alla morte cellulare.

È ormai noto da almeno vent'anni che l'apoptosi è un *pathway* chiave contro la proliferazione delle cellule tumorali. Gli stimoli che inducono l'apoptosi sono molteplici: fattori oncogenetici, danni

cellulari, severe mutazioni geniche e genomiche. In alcuni casi la resistenza ad agenti antineoplastici è connessa con il mancato innesco di pathways apoptotici.

Le cellule tumorali evolvono una serie di strategie per limitare o eludere l'innesco di eventi apoptotici; la più comune è la perdita di TP53. Altri *pathways* che possono eludere gli eventi apoptotici sono: aumento dell'espressione di regolatori antiapoptotici (Bcl-2, Bcl-xL) o di segnali di sopravvivenza (Igf1/2) oppure down regolazione di fattori proapoptotici (Bax, Bim, Puma). La molteplicità dei meccanismi elusivi dell'apoptosi riflette presumibilmente la diversità dei segnali che inducono l'apoptosi.

L'apoptosi può esser innescata attraverso due *pathways* uno estrinseco ed uno intrinseco. Il primo si attiva quando gli stimoli derivano dall'esterno della cellula (FAS ligando-recettore) mentre il secondo, integra e coordina i segnali che derivano dall'ambiente intracellulare. Entrambi i pathways culminano con l'attivazione rispettivamente delle caspasi 8 e 9. Da qui inizia la cascata proteolitica, promossa dall'attivazione delle caspasi, che comporta un progressivo disassemblamento delle cellule, formazione dei corpi apoptotici e morte.

Bcl-2 con Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 ed A1 sono inibitori dell'apoptosi legandosi e bloccando le due proteine proapoptotiche Bax e Bak, che si trovano nella membrana mitocondriale esterna. Se attivate perturbano l'integrità della membrana mitocondriale esterna causando così il rilascio di proteine di segnalazione proapoptotiche, la più importante delle quali è il citocromo *c*. Il citocromo *c* rilasciato attiva una cascata di caspasi inducendo i molteplici cambiamenti cellulari previsti dall'apoptosi.

2.1.3.4 Immortalità cellulare

L'illimitato potenziale replicativo contraddistingue le cellule tumorali rispetto alle cellule non tumorali, nelle quali è associata alla senescenza cellulare. La senescenza è uno stato non proliferativo tipicamente irreversibile che culmina con la morte cellulare.

La senescenza cellulare è connessa con la lunghezza dei telomeri, ripetizioni esanucleotidiche in tandem, che si accorcia progressivamente ad ogni ciclo cellulare fino a perdere la capacità di proteggere l'estremità del DNA da fusioni con le estremità degli altri cromosomi.

L'espressione della telomerasi è quasi assente nelle cellule non immortalizzate o nelle cellule non tumorali, ma espressa nella stragrande maggioranza (circa 90%) delle cellule immortalizzate, comprese le cellule tumorali umane. Allungando il DNA telomerico la telomerasi è in grado di contrastare il progressivo accorciamento dei telomeri che si verifica in sua assenza. Questo può esser raggiunto meno frequentemente, tramite un meccanismo alternativo di mantenimento dei telomeri basato sulla ricombinazione.

È stato visto che le sequenze telomeriche, essendo sequenze ricche in guanine possono foldarsi in strutture chiamate G-quadruplex, ampiamente trattate più avanti. La lunghezza del DNA telomerico detta quante duplicazioni cellulari si possono avere, prima che la lunghezza dei telomeri sia tale da far entrare la cellula in senescenza. L'accorciamento dei telomeri è visto come un orologio che mantiene il potenziale replicativo limitato nelle cellule normali ma eluso dalle cellule tumorali.

Il folding del DNA telomerico in G-quadruplex ha dimostrato inibire l'attività della telomerasi, DNA polimerasi RNA dipendente che sintetizza il DNA telomerico solo se una porzione del filamento stampo è accessibile all'enzima (Brooks et al., 2010). L'inattivazione della telomerasi potrebbe essere un inibitore specifico del cancro, in quanto attivata nel 80-90% dei tumori. Un altro aspetto molto importante potrebbe essere la stabilizzazione dei G-quadruplex, in modo da rendere il DNA inaccessibile alla telomerasi e bloccare il suo allungamento.

2.1.3.5 Angiogenesi

Come i tessuti normali anche i tumori richiedono nutrienti ed ossigeno, nonché la possibilità di eliminare metaboliti ed anidride carbonica. La formazione di un sistema vascolare è chiamata angiogenesi, processo tanto importante quanto complesso. Durante l'embriogenesi, lo sviluppo del sistema vascolare comporta la nascita di nuove cellule endoteliali ed il loro assemblaggio in capillari (vasculogenesi) in aggiunta alla produzione (angiogenesi) di nuovi vasi da quelli esistenti. Nell'adulto e nella maggior parte dei processi fisiologici, l'angiogenesi è attiva ma solo transitoriamente mentre nelle neoplasie l'"interruttore angiogenico" è quasi sempre attivo.

La neovascolarizzazione tumorale è segnata da una precoce genesi capillare, una contorta ed eccessiva ramificazione dei vasi, vasi distorti e dilatati, flusso di sangue irregolare, micro emorragie e livelli non fisiologici di proliferazione delle cellule endoteliali ed assenza d'eventi apoptotici.

L'angiogenesi è regolata da fattori che o l'inducono o la deregolano (Baeriswyl e Christofori, 2009; Bergers e Benjamin, 2003). Alcuni di questi regolatori angiogenici sono proteine di segnalazione che si legano a recettori delle cellule endoteliali stimolandoli o inibendoli. Ben noti induttori ed inibitori di angiogenesi sono rispettivamente fattore di crescita endoteliale vascolare - A (VEGF-A) e trombospondina-1 (TSP-1).

Il gene VEGF-A codifica per ligandi coinvolti nel coordinare la crescita di nuovi vasi sanguigni durante lo sviluppo embrionale e post natale, nell'omeostasi e nella sopravvivenza delle cellule endoteliali durante situazioni patologiche e fisiologiche nell'adulto. È stato dimostrato che membri appartenenti famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), sono implicati nel sostenere l'angiogenesi tumorale, se la loro espressione diventa costitutiva.

TSP-1 è un inibitore dell'angiogenesi legandosi a recettori transmembranari delle cellule endoteliali contrastando gli stimoli proangiogenici.

In passato si pensava che l'angiogenesi fosse importante solo se i tumori erano in rapida crescita. Dati più recenti indicano che l'angiogenesi contribuisce anche durante le fasi premaligne del processo neoplastico.

2.1.3.6 Malignità - invasività e metastasi

Fino al 2000, i meccanismi dell'invasività e della metastatizzazione erano in gran parte un enigma. Era chiaro che carcinomi derivanti dai tessuti epiteliali progredissero ai gradi più alti di malignità, fino all'invasione locale ed a metastatizzazione a distanza. Le cellule tumorali mostrano tipiche alterazioni associate alla loro forma, alla loro interazione con altre cellule e con la matrice extracellulare (ECM).

Il processo multistep d'invasione e metastatizzazione è stato schematizzato come una sequenza di passaggi discreti e ben definiti, talvolta chiamati anche invasione-metastasi a cascata. Questa rappresentazione prevede una successione di cambiamenti all'interno della cellula, a cominciare dall'invasione locale, intravasazione delle cellule tumorali nei vasi sanguigni e linfatici vicini e transito delle cellule tumorali attraverso i sistemi linfatico e sanguigno. Successivamente vi è la fuoriuscita di cellule tumorali dal lume vasale (extravasazione) con l'arrivo nel parenchima tissutale. Qui c'è la formazione di piccoli noduli di cellule tumorali (micrometastasi), ed infine la crescita delle lesioni a tumori macroscopici (Hanahan and Weinberg, 2011).

Cellule tumorali epiteliali guadagnano invasività e capacità migratorie nel processo di transizione mesenchimo-epiteliale (EMT), essenziale per una diffusione metastatica. Il processo EMT si pensa sia responsabile della diminuzione di efficacia di un trattamento e del fallimento della terapia antitumorale. Le cellule tumorali circolanti (CTC), isolate dal sangue di pazienti con carcinoma mammario, possono essere collegate alle cellule staminali tumorali (CSC) e ai processi di EMT in quanto possono avere caratteristiche di CSC così come presentare i cambiamenti fenotipici caratteristici di EMT. Complessivamente, queste cellule sono predestinate ad essere una fonte attiva di metastasi a causa delle loro potenziali caratteristiche staminali e tratti EMT che consentono a loro di diffondere in modo efficace (Ksiazkiewicz et al., 2012).

L'adesione cellula-cellula determina la polarità cellulare, partecipa alla differenziazione cellulare, alla creazione ed al mantenimento dell'omeostasi tissutale. Durante l'oncogenesi, questi fenomeni d'adesione sono modificati dai cambiamenti genetici ed epigenetici, causando così cambiamenti nel signaling cellulare, perdita d'inibizione da contatto e le alterate interazioni fra la migrazione cellulare e le cellule stromali. Un'importante classe di molecole d'adesione cellula-cellula è la

superfamiglia delle caderine. Il membro capostipite è l'E-caderina nota già dagli anni 90 come potente soppressore dell'invasione tumorale e di metastasi. Da allora molte caderine e proteine correlate alla caderina sono state individuate ed un numero crescente è stato implicato nel cancro, come soppressori tumorali presunti o come proto-oncogeni.

La downregolazione spesso osservata e le mutazioni che portano all'inattivazione di E-caderina nei carcinomi umani, hanno fornito un ruolo peculiare nella malignità (Berx and van Roy, 2009).

Il microambiente tumorale è un elemento non intrinseco al tumore, ma altrettanto importante e determinante la sua genesi e progressione.

Il ruolo del microambiente tumorale nel corso degli anni è divenuto via via sempre più importante. La massa tumorale possiede una pleora di cellule apparentemente non tumorali reclutate che permettono il mantenimento ed il consolidarsi degli “*hallmarks*” ovvero il microambiente tumorale. Vi sono differenti tipi cellulari connessi con la massa tumorale, come le cellule stromali associate al tumore. Queste sono cellule apparentemente non tumorali, pur essendo intimamente associate alla massa tumorale, che ne costituiscono lo stroma e diventano promotrici attive della trasformazione neoplastica.

Queste caratteristiche, includendo il microambiente tumorale, i cambiamenti metabolici e l'elusione del sistema immunitario, sono acquisite e mantenute durante la trasformazione neoplastica e l'acquisizione di potenziale tumorigenico. Studiando sempre più nel dettaglio gli “*hallmarks*”, si potrà progredire sempre di più nella comprensione e nel trattamento delle neoplasie.

2.1.3.7 Cambiamenti metabolici del tumore.

I tessuti umani normali convertono la maggior parte dello zucchero (glucosio) che consumano ad acido piruvico tramite la glicolisi. La glicolisi è il processo metabolico mediante il quale, in condizioni di anaerobiosi, una molecola di glucosio è scissa in due molecole di piruvato al fine di generare 2 molecole di ATP e 2 molecole di NADH per ogni molecola di glucosio utilizzata. Il piruvato, traghettato nei mitocondri, sarà completamente ossidato a CO₂ ed acqua grazie al ciclo di Krebs ed alla fosforilazione ossidativa. L'energia libera derivata da questo processo, dipendente dall'ossigeno, è utilizzata per la sintesi di ATP da ADP e fosfato inorganico (Pi) grazie all'ATP sintasi. Questo grande complesso enzimatico, situato nella membrana mitocondriale interna, comprende i sistemi di sintesi e di trasporto di ADP e Pi. Complessivamente per ogni molecola di glucosio si sintetizzano 36 molecole di ATP ed un elevato potere riducente (Pedersen, 2007).

Le cellule normali in presenza di un adeguato apporto di ossigeno utilizzano principalmente la fosforilazione ossidativa per la sintesi di ATP, processo che avviene nei mitocondri. La glicolisi non necessita di ossigeno, ma la produzione di ATP è nettamente inferiore.

Otto Warburg osservò una caratteristica peculiare del metabolismo energetico tumorale. Anche in presenza di ossigeno, le cellule tumorali riprogrammano il metabolismo del glucosio e la loro produzione di energia, limitando così il loro metabolismo energetico in gran parte alla glicolisi chiamata "glicolisi aerobica" (Hanahan and Weinberg, 2011; Warburg, 1930; Warburg, 1956).

Una cellula tumorale, come le cellule in rapida divisione cellulare, necessitano di fonti di carbonio per sostenere la rapida proliferazione. La glicolisi e la via del pentoso fosfato sono fonti di precursori per la biosintesi degli acidi nucleici, fosfolipidi, acidi grassi, colesterolo e porfirine. Così, mantenendo una glicolisi elevata all'interno di ogni cellula tumorale, anche in presenza di ossigeno (effetto Warburg) non solo si assicura l'apporto nutrizionale al tumore ma anche la sua rapida crescita. Un secondo vantaggio dell'effetto *Warburg* è probabile sia rivolto alla protezione del tumore e dell'invasione. Le cellule tumorali attraverso glicolisi aerobica, anche in presenza di ossigeno, producono acido lattico e sono in grado di rilasciarlo all'esterno. Si potrebbe pensare che anche una sola molecola di glucosio, potrebbe esser convertita in acido lattico. Il pH acido può proteggere le cellule tumorali contro attacchi del sistema immunitario ed indurre effetti sulle cellule normali circostanti, preparandole così per l'invasione. Infine l'effetto Warburg assicura anche un tempo di sopravvivenza più lungo al tumore nel caso l'ossigeno possa diminuire, perché gli enzimi che catalizzano la glicolisi non dipendono direttamente da ossigeno. Inoltre i geni che le codificano per gli enzimi glicolitici in cellule tumorali sono attivati da condizioni d'ipossia. Il fatto che le cellule tumorali presentino l'effetto Warburg, potrebbe esser interpretato come un segno di longevità cellulare, anche in condizioni fortemente ipossiche (Hanahan and Weinberg, 2011; Pedersen, 2007). L'effetto *Warburg* e la concezione che le cellule tumorali abbiano un metabolismo alterato è stato per anni accantonato, per poi esser ripreso ed acquisire sempre più spazio. Il metabolismo energetico di una cellula tumorale è apparentemente illogico. Perché scegliere la glicolisi che ha una resa in produzione di ATP 18 volte inferiore rispetto alla fosforilazione ossidativa? Questo potrebbe esser spiegato attraverso l'upregolazione dei trasportatori del glucosio, in particolare GLUT1, che aumenterebbero l'*uptake* citoplasmatico di glucosio (Jones e Thompson, 2009) (Upadhyay et al., 2013).

L'incremento della glicolisi ha dimostrato esser associato con l'attivazione di oncogeni (per esempio, RAS, MYC) ed oncosoppressori (come ad esempio TP53), le cui alterazioni sono state selezionate principalmente per i benefici nel conferire *hallmarks* neoplastici quali: proliferazione cellulare, evitare controlli citostatici e mancanza d'eventi apoptotici.

L'aumento dell'efficienza glicolitica può essere ulteriormente accentuata in condizioni d'ipossia peculiare di molti tumori, upregolando i trasportatori del glucosio e gli enzimi glicolitici. Così, sia

l'oncoproteina Ras e che l'ipossia possono aumentare in modo indipendente i livelli dei fattori di trascrizione HIF1a e HIF2a, che a loro volta upregolano la glicolisi (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'effetto Warburg è il processo biologico sfruttato durante un'analisi PET. Il 2-fluoro2-deossi-D-glucosio (FDG) è l'analogo strutturale e radioattivo del glucosio utilizzato nell'analisi PET. FDG al C2 ha legato il ^{18}F . FDG entra nelle cellule tumorali tramite i trasportatori del glucosio GLUT1 e GLUT3 e fosforilato dall'esochinasi FDG-6-fosfato come se fosse glucosio, così da non poter più uscire dalla cellula. Il glucosio-6-fosfato subisce un'ulteriore isomerizzazione a fruttosio-6-fosfato nella via glicolitica o nell'ossidazione del 6-fosfogluconolattone nella via dei pentoso fosfati, a differenza del FDG-6-fosfato che non può essere ulteriormente catabolizzato a causa della mancanza di un atomo di ossigeno in posizione 2. L'efficacia del FDG come tracciante è vincolato sia all'espressione del trasportatore di glucosio che all'attività esochinasica e può fornire un modo per valutare la velocità di assorbimento di glucosio nelle cellule. In questo modo le cellule tumorali o in generale metabolicamente molto attive, incamerando glucosio più velocemente rispetto ai tessuti circostanti, saranno visualizzate in maniera non invasiva nei pazienti oncologici da FDG –PET (Hanahan and Weinberg, 2011; Pedersen, 2007).

2.1.3.8 Instabilità genomica e mutazioni.

L'instabilità genomica è una caratteristica di quasi tutti i tumori umani, ma in quale fase dello sviluppo del cancro nasce e qual è la sua base molecolare sono questioni a cui stiamo cominciando solo ora a rispondere (Negrini et al., 2010). Le mutazioni e le alterazioni geniche-genomiche sono alla base della trasformazione e progressione neoplastica; gran parte delle cellule tumorali presentano alterazioni cromosomiche. Questa caratteristica peculiare delle cellule tumorali, ha permesso che divenisse un importante campo di studi e ricerche. Le idee che mutazioni genetiche possano essere cause del cancro e che lo sviluppo di nuove tecniche molecolari per caratterizzare sempre la genetica del cancro hanno portato al paradigma gene-centrico. Questo propone che l'identificazione di mutazioni genetiche causali porteranno alla comprensione dei meccanismi molecolari del cancro ed a migliori trattamenti mirando a sovvertire l'effetto del gene mutato (Hanahan and Weinberg, 2011; Heng et al., 2013). Il concetto di gene come chiave della terapia e dell'insorgenza del tumore non è però riuscito. Progetti di sequenziamento del Genoma del Cancro hanno sequenziato migliaia di tumori ed hanno dimostrato in modo schiacciante che la stragrande maggioranza delle variazioni genetiche non sono condivise tra i pazienti. Questi risultati certamente sfidano l'attuale quadro della teoria del cancro (Vincent, 2011). In realtà, questo risultato era stato previsto all'inizio dell'era sequenziamento del genoma del cancro, in quanto ci si rese conto che l'attuale teoria della mutazione genica somatica si basa su alcuni tipi di cancro eccezionali definite

da un modello lineare di progressione come potrebbe esser CML (leucemia mieloide cronica). La maggior parte dei tumori solidi progredisce stocasticamente guidati da una spiccata alterazione genomica, mostrando una schiacciante eterogeneità ed una forte instabilità cromosomica (Heng et al., 2013). Alcuni genotipi mutanti possono conferire un vantaggio selettivo a cloni di cellule tumorali, consentendo loro di crescere e di poter esercitare una dominanza sul tessuto locale. Di conseguenza, la progressione del tumore *multistep* può essere rappresentata come una successione di espansioni clonali, ciascuna delle quali viene attivata dall'acquisizione abilitante di un genotipo mutante. La straordinaria capacità dei sistemi di controllo e di “manutenzione” del genoma volti a rilevare e risolvere i difetti del DNA, assicurano che i tassi di mutazione spontanea siano di solito molto bassi durante ogni generazione cellulare. Grazie all'acquisizione dei geni mutanti necessari per orchestrare la tumorigenesi, le cellule tumorali possono aumentare i tassi di mutazioni. Studi definiti *high-throughput* suggeriscono che pochissimi geni sono mutati, eliminati e/o amplificati in forme di cancro sporadico umano. Questi sono il soppressore tumorale TP53 e geni che regolano positivamente la crescita cellulare (come gli oncogeni EGFR e RAS) o negativamente (come i geni oncosoppressori CDKN2A e PTEN). Si pensava che l'inattivazione di TP53 avrebbe portato ad instabilità genomica. Tuttavia, la delezione del gene TP53 in modelli di topo e cellule umane non ha portato ad aneuploidie e nelle lesioni precancerose, l'instabilità genomica è presente prima della costruzione del mutante. Al contrario, l'attivazione di oncogeni, e più in generale delle vie di segnalazione della crescita cellulare, possono indurre la perdita di eterozigosi e l'instabilità genomica in cellule di mammifero *in vitro*, xenotrapianti umani ed in modelli di topo e lievito (Negrini et al., 2010).

2.2 CARCINOMA MAMMARIO

Il cancro al seno è il tumore femminile più comune e la principale causa di morte per cancro nelle donne. Nel 2012 il cancro al seno è stato il tumore maggiormente diagnosticato nelle donne in Europa (Ferlay et al., 2013). In molti paesi in via di sviluppo, tra cui Asia, Africa, Corea del Sud ed India, l'incidenza e la mortalità per il cancro al seno è aumentata; questo in relazione allo stile di vita sempre meno sano. Il mantenimento del controllo del peso, il condurre una vita sana minimizzano in modo considerevole l'incidenza di cancro al seno. La diagnosi precoce attraverso mammografia ha mostrato un aumento dei successi terapeutici, anche se questo approccio unito al costo elevato ha un grado di fattibilità molto basso per i paesi in via di sviluppo. La diagnosi precoce in questi paesi è legata ad una maggior consapevolezza dei primi segni (Jemal et al., 2011).

Negli ultimi anni, numerosi studi di proteomica su grande scala sono stati effettuati per caratterizzare l'intero proteoma del cancro al seno. Tuttavia, questa strategia porta ad un insieme di dati estremamente complessi, che rendono difficile identificare proteine sensibili e specifiche mirate per il cancro al seno (A R Green and J M Garibaldi, 2013). I tipi di cancro al seno più comuni sono: il carcinoma duttale nell'ordine del 85%-90% ed il carcinoma lobulare che ha un'incidenza dell'8% circa. Questi prendono il nome dall'area della mammella in cui si formano. La restante parte dei tumori mammari meno ricorrenti include il cancro al seno infiltrante ed infiammatorio (Munagala et al., 2011). Le pazienti affette da tumori responsivi agli estrogeni (ER) e/o al progesterone (PR), in quanto ne esprimono i recettori, hanno un minor rischio di mortalità dopo la diagnosi rispetto alle pazienti con tumori ER e/o PR negativo (Dunnwald et al., 2007). La principale classificazione dei tumori al seno è basata sulla rilevazione dei recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR). La presenza o l'assenza dei recettori ormonali, con l'aggiunta del fattore di crescita epidermico-2 (HER2) richiedono una sottoclassificazione molecolare più dettagliata dei tumori al seno (Rebecca Ritte1, 2013). Di seguito ne verranno riportati alcuni esempi. Sottotipi di tumore al seno sono definiti attraverso l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER), recettore del progesterone (PR), e HER2. Inoltre tumori ER negativi (ER-), PR negativi (PR-) ed HER2 negativi (-HER2), sono anche classificati come fenotipo triplo negativo (ER-/PR-/HER2-). I tumori che esprimono citocheratina 5/6 (CK5/6) o citocheratina 5 (CK5) e/o il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) rappresentano un altro sottotipo di tumore al seno, noto come CBP. Questo è caratterizzato da ER-/PR-/HER2-, CK5 o CK5/6 positivo ([CK5 o CK5/6]+), e/o EGFR positivo (EGFR+). CBP come gruppo istochimico è stato utilizzato per riepilogare i tumori mammari "basale-like" a cui può esser associata una prognosi a breve ed a lungo termine (Yang et al., 2011).

2.2.1 Incidenza e fattori di rischio

Secondo AIRC ogni anno ci sono circa trentamila nuovi casi di carcinoma mammario e negli ultimi sei anni c'è stato un incremento del 13.8%. Circa il 45% della riduzione della mortalità nei paesi occidentali, Italia compresa, può esser associata allo screening mammografico. Infatti negli ultimi 25 anni, nel nord America ed in diversi paesi europei, i tassi di mortalità dovuti a carcinoma mammario sono diminuiti sia grazie alla diagnosi precoce che a terapie più efficaci.

In Italia l'incidenza del cancro al seno varia in base alla posizione geografica. Con 115 casi su 100.000 donne (45.000 nuovi casi ogni anno), di cui il 29 % registrato come diagnosi di tumori maligni. Vi sono rilevanti differenze tra Nord, Centro e Sud Italia dovute sia allo screening mammografico che a diversi fattori di rischio es. diversi stili di vita (Clavarezza et al., 2012). Il Nord Italia ha uno stile di vita più simile a quello del Nord Europa e degli Stati Uniti rispetto al Sud Italia, paesi in cui si rileva un'incidenza di carcinoma mammario molto alta (Ferlay et al., 2013). In Italia il cancro al seno provoca più di 11.000 morti l'anno senza nessuna differenza rilevante tra Nord Centro e Sud Italia, anche se la sopravvivenza a 5 anni è compresa tra 85 % e il 87 % nel Nord e Centro Italia, rispetto al 81 % del Sud Italia. Questa differenza si ritiene esser dovuta alla diversa possibilità di accedere al programma di screening mammografico (Clavarezza et al., 2012).

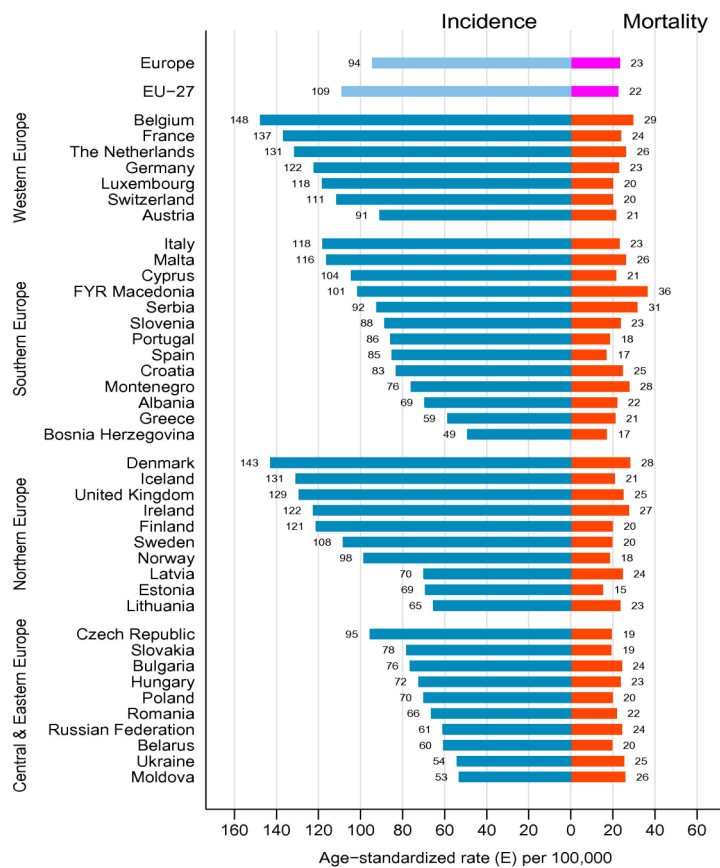


Figura 2.2: Incidenza e mortalità del il tumore al seno nei paesi Europei nel 2012. Tasso standardizzato per età, su 100000 donne.

In figura 2.2 è riportata l'incidenza in relazione alla mortalità per il carcinoma mammario in alcuni paesi. Come si può notare dalla figura 2.2 esiste una variazione d'incidenza e di mortalità in accordo con una chiara distribuzione geografica. Questi dati riflettono la variabilità delle politiche del sistema sanitario rispetto all'importanza della sensibilizzazione verso lo screening mammografico e/o le visite senologiche. Tra i diversi paesi variano i fattori di rischio, le disparità dello sviluppo socio-economico e le misure di controllo del cancro (Ferlay et al., 2013).

Il carcinoma mammario è una malattia molto complessa caratterizzata da molteplici alterazioni molecolari. Tuttavia i differenti comportamenti e risposte alla terapia, anche all'interno delle stesse tipologie di tumori, indicano che i fattori prognostici che abbiamo a disposizione sono insufficienti nel riflettere le eterogeneità neoplastiche. È noto che la diagnosi precoce ed il tempestivo intervento potrebbero migliorare drasticamente la sopravvivenza del paziente a 5 anni. Attualmente diversi approcci, come mammografia, sono stati applicati nella diagnosi del tumore mammario. Tuttavia, questi approcci diagnostici comuni si possono rivelare talvolta insoddisfacenti. Pertanto, vi è un'urgente necessità di trovare approcci diagnostici sempre più mirati e tempestivi.

Diversi sono i fattori di rischio caratteristici del carcinoma mammario ed è molto importante capire come lo stile di vita, le componenti genetiche e la storia clinica delle pazienti possa aiutare nella prevenzione, nella diagnosi e nel trattamento della patologia.

Fattori che influenzano la durata dell'esposizione cumulativa agli ormoni durante la vita riproduttiva, come l'età del menarca, l'età del primo parto, il tempo tra l'età del menarca e il primo parto, il numero di figli, l'uso di contraccettivi orali (OC) e l'allattamento sono stati suggeriti essere associati a rischio di tumori responsivi alla terapia ormonale HR-positivi (ER+ oppure ER+ PR+ insieme). Tuttavia, i fattori di rischio per carcinomi HR-negativi (ER-; PR-; ER-/PR-) e le eziologie di HR positivi ed HR negativi rimangono ancora poco chiare. Vi sono studi epidemiologici però che dimostrano come in età post menopausa l'incidenza di tumori HR-negativi diminuisce molto, suggerendo una correlazione fra ormoni sessuali prodotti durante i cicli ovarici e l'insorgenza di tumori HR-negativi (Rebecca Ritte1, 2013). L'evidenza epidemiologica suggerisce che le associazioni tra rischio di cancro al seno, fattori di rischio genetici e non, variano a seconda della patologia tumorale. Tumori CBP mostrano caratteristiche insolite che includono la correlazione tra portatrici di BRCA1 mutato e le donne afro-americane. Carcinomi CBP sono associati a specifici modelli istologici, quali il carcinoma midollare o metaplastico. Caratterizzare le associazioni tra i fattori di rischio di cancro al seno e sottotipi di tumore a cui si riferiscono possono consentire una migliore valutazione dei rischi per specifici sottotipi di tumore. Ciò può portare alla diagnosi precoce e mirata del cancro al seno e l'attuazione di strategie di prevenzione (Yang et al., 2011). Stili di vita ad alto rischio come il fumo, eccessivo consumo di alcool, scarsissima attività fisica ed

una dieta povera, sono fattori collegati a tassi elevati d'incidenza di cancro al seno. Vi sono evidenze sperimentali connesse tra il miglioramento dello stile di vita dopo una diagnosi di cancro al seno ed un ridotto tasso di mortalità (George et al., 2011). Al contrario, tra i malati di cancro, l'adozione di stili di vita sano è associato ad un miglioramento della sopravvivenza, minori rischi di recidive e secondi tumori, ridotta mortalità per cancro ed una migliore qualità della vita. Rispetto alle donne fisicamente inattive sia prima che dopo la diagnosi di tumore al seno, le donne con diagnosi di cancro al seno che hanno incrementato l'attività fisica dopo la diagnosi mostravano un rischio di morte inferiore al 45%. Le donne che diminuiscono l'attività fisica dopo la diagnosi mostrano un rischio di morte triplicato (Zhao et al., 2013).

2.2.2 Approcci terapeutici del carcinoma mammario

Attualmente il cancro al seno non è più considerato come una singola malattia. Differenti sottotipi neoplastici possono essere definiti attraverso test genetici o attraverso l'immunoistochimica. I sottotipi tumorali hanno peculiari fattori di rischio epidemiologico, diverse storie naturali e risposte diverse alle terapie sistemiche e locali. Queste differenze portano i medici che si occupano di cancro al seno a prendere in considerazione i singoli casi all'interno dei vari sottotipi, al fine di valutare gli elementi di prova pertinenti ed arrivare ad un adeguato approccio terapeutico (Goldhirsch et al., 2011).

2.2.2.1 Chemioterapia contro il cancro al seno

Il cancro al seno è una malattia estremamente eterogenea, diversi aspetti tumorigenici ed un disparato comportamento clinico la caratterizzano. Le differenti alterazioni molecolari caratterizzano la crescita, la sopravvivenza e la risposta al trattamento. Farmaci chemioterapici disponibili per il trattamento del cancro al seno possono essere divisi in agenti alchilanti come ad esempio: cisplatino, carboplatino, ciclofosfamide. Abbiamo le antracicline: doxorubicina, epirubicina e idarubicina. Gli alcaloidi vegetali quali paclitaxel, vinorelbina, vindesina e gli inibitori della topoisomerasi: irinotecan, etoposide e teniposide (Figura 2). Nonostante i significativi progressi nella diagnosi precoce e costante progresso nel trattamento con farmaci sistemici, la maggior parte dei tumori al seno sviluppano resistenza ai farmaci. Negli ultimi anni, la comprensione dei meccanismi biologici sottostanti la carcinogenesi e gli eventi molecolari alterati hanno portato all'identificazione di nuovi bersagli molecolari e sviluppo di terapie mirate. Negli ultimi due decenni, diversi anticorpi monoclonali e molecole inibitori sono stati sviluppati e testati attraverso studi clinici.

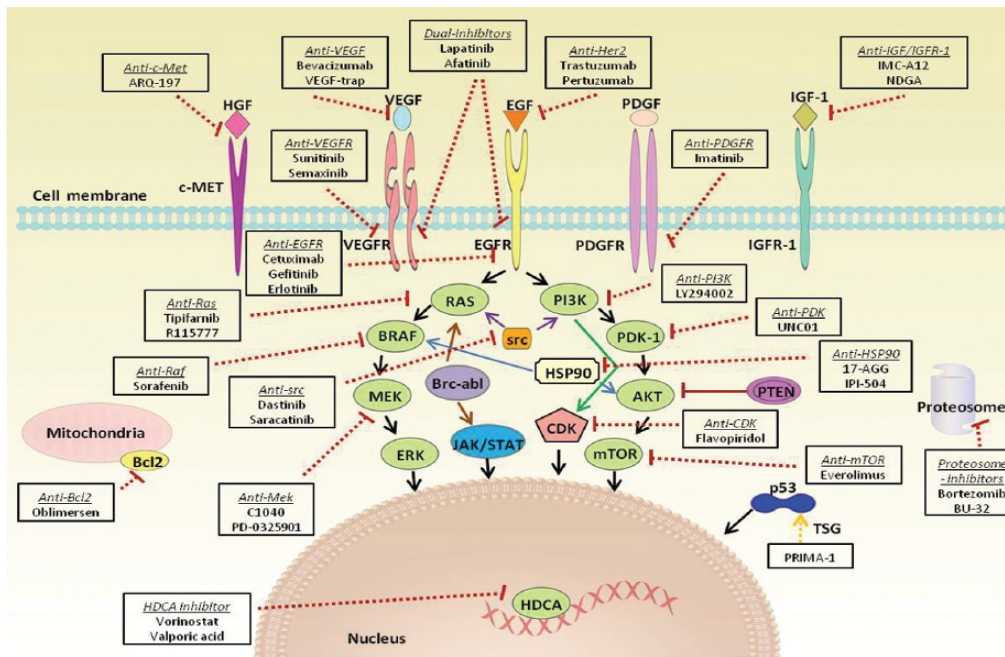


Figura 2.3: Pathways intracellulari di trasduzione del segnale implicati nella proliferazione e progressione del cancro al seno. Terapie mirate ed i relativi processi sono qui rappresentati. EGF - fattore di crescita epidermico; EGFR - recettore EGF; HGF - fattore di crescita degli epatociti; c-MET - fattore di transizione mesenchimale – epiteliale; PDGF - fattore di crescita derivato dalle piastrine; PDGFR - recettore PDGF; IGF-1 - insulin-like growth factor-1; IGF-1R - IGF-1 recettore; PI3K - fosfatidilinositolo 3-chinasi; Ras - Rat sarcoma sottofamiglia delle GTPasi; AKT - proteina chinasi B; PDK1 - piruvato deidrogenasi chinasi isoenzima 1; mTOR - bersaglio della rapamicina nei mammiferi; MEK – mitogen activated protein chinasi; VEGF - fattore di crescita vascolare endoteliale; VEGFR - recettore VEGF; BRAF - RAF chinasi di tipo B; src-v - virus del sarcoma di Rous tirosin-chinasi ; BCRABL - il cromosoma Philadelphia; JAK/STAT - Janus chinasi/trasduttori del segnale ed attivatori trascrizionali; PTEN - fosfatasi e tensin omologhi; HDAC - istone deacetilasi.

I loro bersagli sono: la crescita cellulare, la sopravvivenza, l'angiogenesi ed il fenomeno della metastatizzazione. Molti di questi agenti mirati hanno migliorato la sopravvivenza dei pazienti. Uno dei primi e più sviluppato nel campo della terapia mirata con trastuzumab è un anticorpo monoclonale (Mab) anti HER2 e si è rivelato efficace nel trattamento delle donne con tumore al seno HER2 - positivo. In tempi più recenti è stato sviluppato il lapatinib. Questo è un inibitore reversibile e selettivo sia di HER1 che di HER2 e bevacizumab, un anticorpo monoclonale contro il fattore di crescita vascolare endoteliale VEGF. Inoltre sia HER2 con trastuzumab e VEGF con Bevacizumab, in combinazione con la chemioterapia, è diventata una nuova strategia terapeutica molecolare mirata nel carcinoma mammario. Altri target molecolari tirosin-chinasici (come Src) sviluppati negli ultimi tempi sono il fattore di crescita insulino-simile (IGF)/IGF-recettore (IGFR), gli inibitori PI3K/Akt/mTOR, inibitori del pathway RAS/MEK/ERK; agenti che promuovono l'apoptosi come poli ADP ribosio polimerasi (PARP) ed agenti inibitori dell'invasività e metastatizzazione come inibitori di MMP (metalloproteinasi) (Figura 2.3) (Munagala et al., 2011).

2.2.2.2 Radioterapia nel trattamento del cancro al seno

Il cardine del trattamento al tumore al seno è la chirurgia, combinata alla radioterapia (RT) e trattamenti oncologici sistemici. A seconda delle caratteristiche del tumore e le preferenze del paziente, la chirurgia conservativa al seno e la mastectomia sono le opzioni chirurgiche al momento più efficaci. Il trattamento radioterapico è una pratica clinica ormai assodata nel trattamento del tumore al seno. Grazie alla significativa riduzione del rischio di recidiva del 12% per i pazienti con 1-3 linfonodi ascellari positivi grazie alla PMRT (radioterapia post mastectomia), il numero di pazienti trattati con PMRT sono in aumento. Tuttavia sono però noti i fattori di rischio connessi con la radioterapia in seguito ad un immediato intervento ricostruttivo del seno (Eriksson et al., 2013).

Il concetto di cellule tumorali radiosensibili e radioresistenti è ben riconosciuto. Con la nuova caratterizzazione dei diversi fenotipi molecolari tumorali del cancro al seno, i medici e radiobiologi si sono avvicinati sempre più al concetto delle curve dose-risposta. Questi cambiamenti genetici hanno un'impronta prognostica che si traduce in risposte diverse a vari trattamenti e sopravvivenza, ma l'entità del loro effetto sulla risposta radioterapica è da poco esplorato. La sostanziale eterogeneità delle mutazioni sul DNA tra i tumori al seno può spiegare le grandi differenze di fenotipi, sia in termini di comportamento del tumore, così come responsività alla terapia. Questi risultati aprono una strada terapeutica nel trattamento e forniscono strategie antitumorali non utilizzabili prima. Ciò ha stimolato un nuovo interesse nel rivisitare i processi di riparazione al DNA da danni da radiazioni. I dati indicano che le vie di segnalazione HER2, EGFR/PI3K/Akt giocano un ruolo fondamentale nella modulazione della sopravvivenza post-irraggiamento. Questi percorsi sono coinvolti nella radiosensibilità, nella proliferazione tumorale e nell'ipossia. Pertanto, agendo su questi meccanismi si potrebbe arrivare a trattare efficacemente cloni cellulari radioresistenti (Kaidar-Person et al., 2013).

La radioresistenza rimane una barriera per raggiungere la massima efficacia mediante la radioterapia del cancro al seno. La radioresistenza può essere presente all'inizio della terapia, causando nei pazienti una non responsività iniziale al trattamento (radioresistenza intrinseca), o può emergere nel tempo durante radioterapia (radioresistenza acquisita) che si traduce poi nel fallimento del trattamento. In radioterapia il frazionamento è spesso usato per facilitare il recupero dei tessuti normali. È l'apoptosi, o morte cellulare programmata, il meccanismo di morte cellulare indotto da radiazioni in cellule cancerose. Esso è regolato da complesse interazioni tra le proteine anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, e proteine pro-apoptotiche, tra cui Bax, Bak, Bad e Bim. La *down* regolazione delle proteine anti-apoptotiche può promuovere l'apoptosi e migliorare la radiosensibilità delle cellule tumorali. L'interruzione di percorsi anti-apoptotici è un nuovo bersaglio per superare radioresistenza nel tumore al seno (Li et al., 2012).

In seguito alla chirurgia conservativa al seno, alcune foci microscopiche potrebbe rimanere nella porzione del seno preservata dalla chirurgia. Lo scopo della radioterapia è quello di sradicare questi focolai ed evitare che recidive locali possano in seguito portare a metastasi a distanza. Dopo la chirurgia, la radioterapia all'incirca dimezza il rischio di recidiva in una vasta gamma di pazienti (Matthijs V. Nijenhuis 2013). Tramite un trattamento radioterapico ideale si massimizza il rapporto tra dose somministrata al tumore rispetto al tessuto normale circostante, anche se per molti tumori esiste una chiara relazione tra dose di radiazione somministrata e la probabilità di controllo del tumore stesso, anche se la dose al tumore è spesso limitata dalla tolleranza alla radiazione delle strutture circostanti. A questo riguardo viene in aiuto la radioterapia ad intensità modulata (IMRT). È uno dei più importanti progressi in oncologia degli ultimi dieci anni. Miglioramenti in termini di tecnologia informatica e di tecniche di *imaging* hanno consentito il rapido sviluppo di questa modalità di trattamento. Ciò fornisce la possibilità sia di ridurre la tossicità tardiva e l'aumento della dose erogata potrebbe portare ad un migliore controllo del tumore ed aumentare le probabilità di sopravvivenza (Taylor and Powell, 2004).

2.3 APPROCCI DI STUDIO

Lo studio del K:D-rib, soluzione acquosa di D-ribosio e KHCO_3 , è stato condotto sfruttando le potenzialità che un approccio multidisciplinare può fornire. Da un lato il lavoro è stato caratterizzato dall'utilizzo di tecniche tipiche della biologia cellulare. Si sono estrapolate informazioni relative al comportamento di due modelli cellulari, se trattati con il K:D-rib. L'approccio cellulare ha previsto l'utilizzo di due linee cellulari Hs-578T (carcinoma mammario umano) e Hs-578Bst (epitelio mammario umano non tumorale) descritte nel paragrafo 2.3.1. Mentre l'approccio di tipo strutturale ha permesso di studiare il K:D-rib, i suoi componenti, e caratterizzare la miscela sotto l'aspetto del suo potere "antiossidante" [1]. Inoltre si è iniziato a studiare il K:D-rib come latore del folding di sequenze nucleotidiche a DNA ricche di guanina (PS2.M e PS5.M) in G-quadruplex, descritti nel paragrafo 2.3.2 [1-3].

2.3.1 Modelli cellulari

Il cancro al seno è la principale causa di morte nelle donne in tutto il mondo con un'incidenza annuale di circa 1,38 milioni [4]. Secondo l'American Cancer Society il tumore al seno è il tumore più comune nelle donne americane, eccetto il melanoma. Si è stimato che circa 1 donna su 8 (12%) svilupperà un carcinoma durante la sua vita. Secondo WHO (World Health Organization) il cancro al seno è il tumore con maggior incidenza nelle donne sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli economicamente avanzati. L'incidenza nei paesi in via di sviluppo è aumentata con l'allungamento della vita media (il tumore al seno ha un'incidenza maggiore nelle donne tra i 50 anni ed i 75 anni), all'intensa urbanizzazione ed al progressivo tendere ad uno stile di vita molto simile ai paesi economicamente più evoluti.

Gli importanti dati epidemiologici uniti all'incidenza del carcinoma mammario sempre più in aumento, hanno portato a condurre questi studi su due modelli cellulari quali il carcinoma mammario (HTB-126) Hs578T e l'epitelio mammario umano non tumorale (HTB-125) Hs 578 Bst. La linea HTB-126 deriva da un carcinosarcoma umano di origine epiteliale. Dalla stessa paziente, donna caucasica di 72 anni, è stata stabilizzata anche la linea cellulare non tumorale HTB-125. Quest'ultima d'origine mioepiteliale, costituiva il tessuto periferico al tumore, talvolta definito anche come tessuto stromale [5]. Quest'aspetto è molto importante in quanto si possono trarre valutazioni su come due modelli cellulari diversi, ma provenienti dalla stessa persona, reagiscono al trattamento con K:D-rib.

2.3.2 G-quadruplex

In biologia molecolare sequenze nucleotidiche ricche in guanina possono formare una struttura planare chiamata tetrade, formata da un appaiamento di quattro guanine. Due o più tetradi impilate una sopra l'altra possono formare i G-quadruplex (noti anche come G-tetradi o G4-DNA). La struttura dei G-quadruplex è ulteriormente stabilizzata dalla presenza di un catione, soprattutto potassio, posizionato nel canale centrale tra una tetrade e la successiva ed essere formati da sequenze di DNA, RNA, LNA e PNA. Possono essere intramolecolari, biomolecolari, o tetramolecolari, a seconda del numero dei filamenti che partecipano alla struttura G-quadruplex. Ed in base alla direzione dei filamenti formanti le tetradi, queste strutture possono essere descritte come parallele o antiparallele (figura 2.4) [6-8].

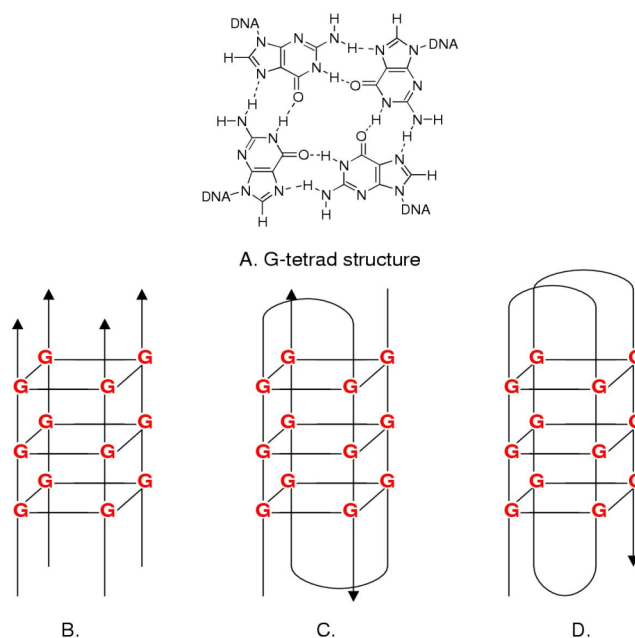


Figura 2.4 Esempio di G-Tetradi e G-quadruplex. A) G-tetrade in cui quattro basi guanina in una disposizione planare sono appaiate con legami idrogeno secondo Hoogsteen; B) G-quadruplex formati da quattro filamenti di DNA paralleli c) G-quadruplex intermolecolari. Due sequenze di DNA con ripetizioni di guanine formano forcine che dimerizzano stabilizzando la struttura biomolecolare. D) G-quadruplex intramolecolare anti-parrallelo in cui un singolo filamento di DNA, con quattro ripetizioni ricche in guanine, si possono piegare su se stesse per formare una struttura G-quadruplex [7].

I G-quadruplex si possono formare sia nelle sequenze telomeriche che in promotori di geni [8-10]. Come precedentemente descritto l'unità fondamentale del G-quadruplex è la tetrade di guanine in cui otto legami idrogeno (N1-O6, N2-N7) con gli O legati ai C6 rivolti verso il centro della tetrade (appaiamenti di Hoogsteen e Watson-Crick) stabilizzano la tetrade formando una struttura simile ad una gabbia antipiramidale bipiramidale [11-13]. I residui di guanina in una tetrade possono adottare

conformazione syn o anti, a seconda di come la base azotata è legata al C1 del deossiribosio. Nel G-quadruplex parallelo le guanine adottano la stessa conformazione mentre in quelli antiparalleli i G-quadruplex adottano conformazione opposta [11]. La tetrad può formare una struttura estesa sfruttando l'aromaticità degli anelli benzenici, ulteriormente stabilizzata dall'associazione con ioni metallici che s'intercalano nel canale centrale. La cavità può ospitare una varietà di cationi metallici che influenzano fortemente non solo la topologia finale del G-quadruplex ma anche la sua stabilità. L'influenza e la stabilità del metallo è legata all'aumentando del raggio atomico. Come si può notare maggiore sarà il raggio atomico e maggiore sarà la stabilità che il metallo conferisce; infatti Li, Na e K hanno la seguente affinità: $Li^+ < Na^+ < K^+$ [11, 13].

I G-quadruplex possono anche avere ruoli biologici. La proteina RAP1, ad esempio, si lega al DNA telomerico di lievito per promuovere la formazione di un G-quadruplex parallelo. In oltre, nuclease-hypersensitivity element III (segmento di acido nucleico ricco in guanine) presente nella regione del promotore del gene c-myc, forma G-quadruplex intramolecolari ed antiparalleli. Il ruolo biologico dei G-quadruplex ha spinto la progettazione di farmaci aventi come bersaglio queste strutture, ma ha anche fornito un impulso per l'utilizzazione dei G quadruplex stessi come agenti terapeutici [14].

2.3.2.1 G-quadruplex telomerici

I telomeri sono complessi nucleo-proteici specializzati che si trovano alle estremità del DNA degli organismi eucariotici. Forniscono protezione contro la digestione e la perdita del DNA dovuta alle endonucleasi ed al susseguirsi dei cicli cellulari. I telomeri inoltre evitano che le estremità del DNA si possano unire generando aberrazioni cromosomiche. I telomeri umani sono ripetizioni in tandem della sequenza TAAGGG fino ad ottenere una lunghezza di 5-10 kb che terminano con un'estremità 3' protrudente di 35-600 basi [15, 16]. Il DNA telomerico è associato a proteine quali Pot1, TRF1 e TRF2, TIN2, Rap1 e TPP1. La struttura e la stabilità telomerica è correlata a tumori, età (n° di cicli che la cellula ha compiuto) e stabilità genetica.

La struttura della sequenza telomerica umana wt 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' (wtTel22) in soluzione in presenza di ioni Na⁺, è stata analizzata tramite NMR. È stata vista una struttura a cesto, intramolecolare, con un mix di topologie parallele ed antiparallele. Le tre tetradi, formate da 4 guanine ciascuna, sono unite da due TAA loop laterali ed uno diagonale. Della stessa sequenza, è stata risolta la struttura cristallina in presenza di K⁺ ed è stato visto che dava una topologia tutta parallela ed intramolecolari come riportati in figura 2.5. Sono presenti tre tetradi di guanina connesse con quattro TAA loop di cui due laterali, uno diagonale ed uno fiancheggiante la struttura [17]. Ulteriori studi hanno mostrato che la struttura reale della sequenza wt22Tel è un ibrido di due strutture, in equilibrio dinamico fra di loro, anche in presenza di un'alta concentrazione di ioni Na⁺.

Ogni ibrido strutturale ha un suo distinto *capping* che può diventare a sua volta un bersaglio terapeutico in quanto sito di legame per farmaci o molecole stabilizzatrici. Le conformazioni ibride suggeriscono che la struttura telomerica potrebbe essere un assemblaggio in più conformeri perfettamente impacchettati [11].

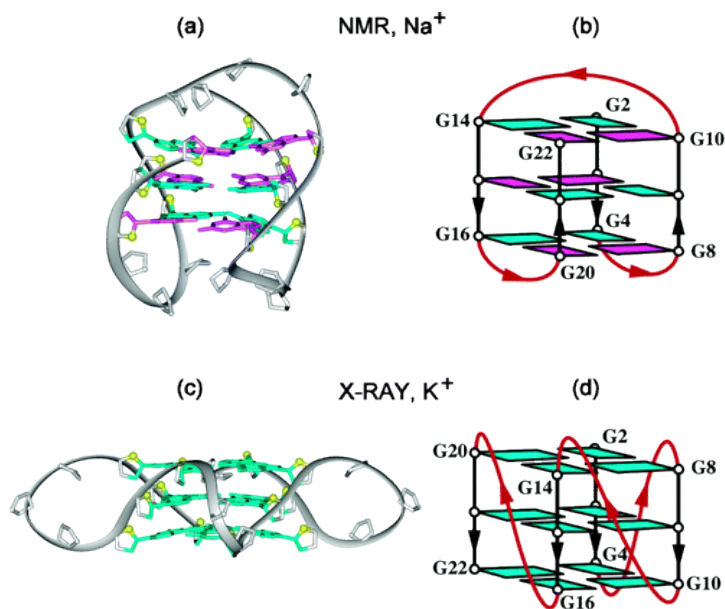


Figura 2.5: Strutture intramolecolari di G-quadruplex formate dalla sequenza telomerica umana. **a** e **b** in presenza di Na^+ ed in soluzione. **c** e **d** cristalli in presenza di K^+ . I loop sono di colore rosso; guanine *anti* e *syn* e sono rispettivamente di colore verde e magenta. Gli atomi O in 4' sono di colore giallo [17].

2.3.2.2 G-quadruplex non telomerici

Studi biofisici *in vitro* su strutture G-quadruplex hanno permesso la formulazione di algoritmi predittivi. L'uso di tali algoritmi come QuadParser [13] e G4P calcolatore [14], ha dimostrato che motivi quadruplex prevalente nei genomi sono presenti in regioni associate alla regolazione genica (compresi promotori), introni e UTR. Queste analisi bionformatiche e biofisiche hanno gettato le basi per confermare sperimentalmente la presenza di queste strutture nelle cellule [18]. Il comportamento dinamico del G-quadruplex nel DNA a doppio filamento potrebbe essere direttamente coinvolto nella regolazione genica a livello trascrizionale, come proposto dal modello in figura 2.6. La possibilità che questo dinamismo regoli l'attività genica è supportata dalla scoperta di un motivo a G-quadruplex all'interno della sequenza promotrice del gene della β -globina di pollo ed in promotori di altri oncogeni [9]. Alcuni esempi paradigmatici di G-quadruplex non telomerici sono riportati di seguito. Prendiamo in esame il caso del promotore dell'oncogene *bcl-2*. L'estremità 5' del promotore P1, includendo una regione altamente ricca GC, è stata implicata nella regolazione della trascrizione di *bcl-2*. Questa è una sequenza di 39 paia di basi che si trova tra la 58esima e la

19 esima base a monte del promotore P1. Una delezione o mutazione di questo elemento ha dimostrato di aumentare l'attività del promotore da 2,1 volte fino a 2,6 volte. Questo filamento ricco in G, in presenza di K^+ , può formare una miscela di tre distinte strutture di G-quadruplex intramolecolari. È significativo notare che il G-quadruplex di bcl-2 rappresenta un'altra struttura terziaria a DNA ben definita assieme a c-MYC. Inoltre, è interessante notare che sia sequenze promotrici di bcl-2 che c-Myc contengono lo stesso motivo GGGN₁GGG, che ha come motivo strutturale una doppia catena parallela inversa. Fatto molto interessante è che le regioni promotrici di VEGF e di HIF-1R contengono lo stesso motivo suggerendo la formazione di un G-quadruplex parallela [19].

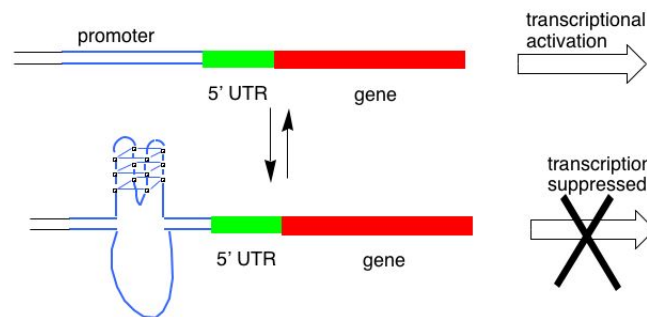


Figura 2.6: Modello proposto della regolazione della trascrizione genica da parte dei G-quadruplex

2.4 CARATTERISTICHE CHIMICHE E BIOLOGICHE DEL D-ribosio

Il D-ribosio è uno zucchero a cinque atomi di carbonio, molecola tanto semplice quanto importante per la vita degli organismi viventi. Il D-ribosio esiste in natura nella forma D, che differisce dalla forma L sono nei gruppi legati al C1 ed al C5; la forma L è sintetizzata solo per scopi farmaceutici e non è presente in natura. Nel RNA, il D-ribosio contribuisce a formare un sistema di catene e fornisce la base per la struttura tridimensionale che trasmette l'informazione. L'elica destrorsa del RNA deriva dalla chiralità del D-ribosio ed un attento confronto tra RNA e il suo enantiomero costituito da L-ribosio fornisce informazioni in merito alla funzione biologica di questo acido nucleico [20]. Il D-ribosio è elemento strutturale di nucleotidi necessari per la vita della cellula (es ATP), di cofattori e coenzimi (es. NAD, FAD) e di secondi messaggeri (es. cAMP).

La via dei pentoso fosfati, è una via metabolica in cui viene prodotto NADPH per le biosintesi riduttive e ribosio5-P per la biosintesi dei nucleotidi, in accordo con il fabbisogno della cellula.

Questa via è finemente regolata in relazione all'aumento di NADPH e D-ribosio-5-P rispetto al fabbisogno della cellula [21]. Non ci sono evidenze definitive che provino una connessione fra la disponibilità di R5P (α -D-ribosio 5-fosfato, elemento iniziale per la biosintesi delle purine) e la sintesi dei nucleotidi. Tuttavia è ipotizzabile che il fornire D-ribosio dall'esterno potrebbe aumentare la concentrazione di 5-PRPP (5-fosforibosyl- α -pirofosfato) ed in questo modo aumentare la sintesi di purine e pirimidine in tempi di bisogno [20, 22]. Molti analoghi strutturali dei nucleosidi contenenti D-ribosio, sono stati sviluppati come agenti antivirali e antitumorali sfruttando quelle che sono le vie metaboliche di questo zucchero [20].

La permeabilità degli zuccheri è un aspetto molto interessante ed è sempre più oggetto di studi. Sacerdote e Szostak investigarono sulla permeabilità del D-ribosio e di alcuni suoi diastereoisomeri (arabinosio, xylosio e lixosio) trovando una marcata permeabilità del D-ribosio rispetto agli altri. Questo fenomeno è stato osservato in doppi strati fosfolipidici quali POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) ed in membrane più semplici costituite da acidi grassi quali acido miristico ed acido oleico. In accordo con simulazioni di dinamica molecolare, che hanno confermato altri dati sperimentali, Wei et al., hanno confermato che il D-ribosio permea più velocemente attraverso POPC rispetto agli altri suoi diastereoisomeri. Differenze nella permeabilità di membrana ad aldopentosi possono essere spiegate, almeno in parte, dai ponti idrogeno tra i gruppi ossidrilici degli zuccheri e porzioni della membrana che chimicamente favoriscono questi legami. Queste interazioni sembrano essere più forti tra D-ribosio e membrana, fornendo così una maggiore stabilità ed una più veloce diffusione dello zucchero rispetto agli altri [23].

Le interazioni fra carboidrati e composti inorganici (es. cationi metallici) sono ambiti di ricerca molto interessanti. Questi sono dovuti all'importanza chimico-biologica dei complessi che si formano. La formazione del complesso zucchero - sale è da imputarsi all'interazione fra il catione (derivante dalla dissociazione del sale) ed i gruppi -OH dello zucchero [24]. L'interazione del D-ribosio con anioni è oggetto di ricerche ed interessi scientifici, dovuti anche al suo presunto ruolo nell'ambiente prebiotico [25]. Nel 2005 Ortiz et al., usarono ^1H and ^{13}C NMR per studiare la speciazione del D-ribosio in soluzione acquosa ed emersero quattro differenti isomeri strutturali: α - and β -furanosio, nella misura di circa il 20% of D-ribosio in soluzione acquosa ed i più stabili α - and β - piranosio corrispondenti al rimanente 80% (Figura 2.7). La catena aperta, indispensabile affinché si possa passare da una struttura all'altra, è presente in misura del 0.2% del totale; normalmente non è rilevabile [24].

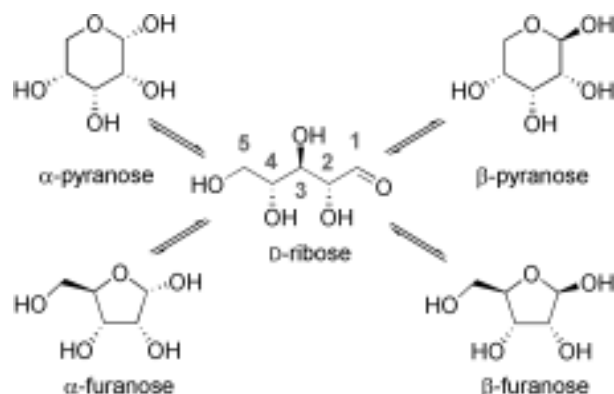


Figura 2.7: Strutture del D-ribosio in soluzione acuosca: miscela di α -e β -piranosio e α -e β -furanosio con la forma β -piranosica predominante

2.5 CARATTERISTICHE CHIMICHE-BIOLOGICHE DEL POTASSIO

Il potassio il cui simbolo è K (deriva dal latino kassium ossia alcali), ha numero atomico 19, numero di massa 39, appartiene al primo gruppo (metalli alcalini) ed al quarto periodo. Ha un raggio atomico di 2.77\AA , un volume atomico di $45.46\text{ cm}^3/\text{mol}$ ed ha un raggio covalente di 2.03 \AA *EnvChemistry.com*. È un metallo molto reattivo e si trova in natura in differenti minerali ed è presente anche nell'acqua di mare.

Lo ione potassio è uno degli ioni più importanti per l'organismo umano. È essenziale per prevenire la contrazione muscolare ed interviene nella genesi e nel mantenimento del potenziale d'azione. Lo ione K^+ costituisce lo 0.4% circa della massa del corpo umano ed è il catione intracellulare più abbondante. La concentrazione fisiologica intracellulare è di circa 150 mM, mentre quella extracellulare è di circa 7 mM [1, 26]. I livelli di potassio nel siero, in condizioni fisiologiche, sono tra 3.8 ed i 5.4 mmol/L [30]. K^+ gioca diversi ruoli in svariati processi biologici tra cui contrazione muscolare, battito cardiaco, trasmissioni nervose ed è implicato nelle funzioni renali. Anomale fluttuazioni di K^+ possono esser indicatori precoci di malattie come: alcolismo, anoressia, bulimia, malattie cardiache, diabete, AIDS e cancro. Eritrociti e cellule epidermiche possono contenere più K^+ intracellulare, rispettivamente tra 200 e 475 mmol. Per i miociti, la concentrazione intracellulare di K^+ è addirittura superiore, arrivando all'ordine delle moli [27].

2.5.1 Canali Potassio, Pompe Na^+/K^+ e cancro

Come descritto nel capitolo degli *hallmarks* vi sono forti connessioni fra proliferazione cellulare, canali del potassio e concentrazioni di potassio/sodio. Evidenze epidemiologiche suggeriscono che un elevato apporto di K^+ inibisce lo sviluppo del cancro, e un elevato apporto Na^+ aumenta l'incidenza di tumori maligni gastrointestinali. Studi derivati dall'analisi di neoplasie epiteliali umane, indicano che la deplezione da K^+ è presente in queste neoplasie e che questo potrebbe contribuire all'aumento intracellulare dello ione Na^+ alterando così il rapporto Na^+/K^+ all'interno della cellula [27, 28]. Nelle cellule tumorali la concentrazione di K^+/Na^+ non è finemente regolata ed un aumento dell'espressione e dell'attività della pompa Na^+/K^+ è stata mostrata in pazienti con cancro allo stomaco ed alla vescica. È stato osservato che livelli di attività dell'ATPasi Na^+/K^+ erano altamente ridotti in una forma invasiva di carcinoma renale umano, cancro uroteliale ed altre linee cellulari di carcinoma stabilizzate da vari tessuti. È probabile che quest'alterazione d'espressione dell'ATPasi Na^+/K^+ sia connessa con la malignità del tumore [28]. L'ATPasi Na^+/K^+ utilizza energia derivante dall'idrolisi di ATP per trasportare K^+ nelle cellule e Na^+ all'esterno entrambi contro gradiente di concentrazione. Il Na^+ se trasportato secondo gradiente, fornisce la forza motrice per il trasporto di altre molecole tra cui: aminoacidi, zuccheri (glucosio) e fosfati [28, 29].

Nel 1932 Moravek e Kishi in una serie di pubblicazioni misero in evidenza l'alta presenza di K^+ all'interno della cellula non tumorale durante l'usuale attività fisiologica. Allo stesso tempo analizzarono anche il contenuto di K^+ nelle cellule neoplastiche (e non solo) appartenenti ad individui ammalati. I valori riportati sono:

- tessuto non tumorale 290 mg %
- tessuto neoplastico in via di sviluppo 50 mg %
- tessuto neoplastico altamente sviluppato 25 mg %
- tessuto neoplastico sviluppato in fase terminale 5 mg % - 0 mg %

Dall'analisi dei tessuti in esame si nota che il K^+ viene sostituito con il Na^+ . Gli studi di Moravek e Kishi si limitarono pertanto alla sola constatazione che nei tumori e principalmente nel sarcoma di Rous, il Na^+ sostituiva il K^+ [28].

2.6 OGGETTO DI STUDIO

Con questo studio, come già ampiamente descritto nell'introduzione, vogliamo caratterizzare diversi aspetti K:D-rib. Questo grazie all'utilizzo di diversi modelli di studio riconducibili ognuno ad un approccio di studio utilizzato. Si vuole studiare l'effetto che il composto ha sulla proliferazione di cellule tumorali (Hs-578T) e l'effetto che ha su cellule non tumorali (Hs-578bst).

Si vuole vedere come cambia il potenziale tumorigenico della linea cellulare tumorale e se la morfologia è alterata. Si analizzerà l'effetto protettivo del K:D-rib, correlabile al suo effetto antiossidante, sull'epitelio mammario non tumorale umano irraggiato in accordo con i protocolli terapeutici ed i dati riportati in letteratura circa le sedute di radioterapia convenzionali. Si investigherà inoltre se sarà presente un uptake di potassio grazie all'utilizzo del DNAzima come biosensore di ioni potassio, grazie a sequenze oligonucleotidiche di DNA ricche in guanina. Queste se foldate in presenza di ioni potassio hanno un'elevata affinità per l'emina, permettendo così la formazione della molecola di DNAzima.

2.6.1 K:D-rib e proliferazione cellulare

Lo studio della proliferazione cellulare è una tappa di fondamentale importanza per lo studio sia dell'effetto di xenobiotici su modelli cellulari che per lo studio del modello stesso. I molteplici metodi per saggiare la proliferazione cellulare o "*hallmark*", se si parla di proliferazione di cellule cancerose, hanno reso lo studio possibile sotto molteplici punti di vista.

Alcune delle tecniche più utilizzate per lo studio della proliferazione cellulare sono: la ricerca di marker specifici di proliferazione (es. Ki67), saggi di tipo metabolico (MTT, XTT, MTS, WST-1, produzione di ATP ecc), la citofluorimetria ed i saggi di proliferazione cellulare in vivo.

Quest'ultima categoria sfrutta animali da laboratorio, come ratti o topi, al fine di valutare in che modo con che tempi un tumore prolifera. La neoplasia può essere inoculata nell'animale (xenotrapianto) attraverso l'infusione di cellule tumorali coltivate in laboratorio oppure sviluppato dall'animale stesso, se geneticamente modificato. Con i saggi *in vivo* è possibile valutare oltre la proliferazione anche il potenziale invasivo-metastatico di una neoplasia ad un livello di complessità maggiore rispetto a quello che sarebbe possibile fare *in vitro*. Questo perché abbiamo architetture tissutali ed un microambiente tumorale che possono favorire oppure ostacolare la proliferazione e/o la progressione neoplastica, aspetto che *in vitro* è molto difficile ricreare. Questi esperimenti richiedono personale specializzato sia per la gestione che per il mantenimento degli stabulari, per tutte le operazioni condotte sugli animali, locali adeguati e fondi onerosi.

Ki67 è un marker specifico di proliferazione cellulare. Durante l'interfase, l'antigene Ki-67 può essere rilevato esclusivamente nel nucleo della cellula, mentre nella mitosi maggior parte della proteina si localizza sulla superficie dei cromosomi. La proteina è presente durante tutte le fasi attive del ciclo cellulare (G1, S, G2 e mitosi), ma è assente in cellule quiescenti (G0). Ampiamente utilizzato sia in diagnostica che in ricerca ci da un'indicazione chiara sullo stato proliferativo del campione che stiamo analizzando. Non ci dice in che fase del ciclo cellulare le cellule si trovano, ma ci dice solo se stanno proliferando oppure no [30].

La citofluorimetria a flusso è una metodica che permette di valutare alcuni parametri fisici, chimici di cellule contenute in una sospensione. Mediante l'uso di una luce laser e di appositi rilevatori ottici, il sistema raccoglie la fluorescenza emessa da un fluorocromo legato ad un anticorpo monoclonale specifico per i recettori di superficie e/o intracitoplasmatici delle cellule. Il segnale raccolto viene poi convertito in un segnale elettronico e graficato. La citofluorimetria è molto utilizzata per l'analisi del ciclo cellulare. Qui sono riportati quattro casi in cui è possibile utilizzare la citofluorimetria a flusso per lo studio del ciclo cellulare. I primi due si basano su l'analisi univariata del contenuto di DNA cellulare in seguito colorazione delle cellule con ioduro di propidio (PI) o 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Quest'approccio rivela la distribuzione delle cellule in tre fasi del ciclo (G1 vs S vs G2/M). Ci permette inoltre l'individuazione delle cellule apoptotiche grazie all'analisi della frammentazione del DNA. Il terzo approccio si basa sull'analisi bivariata di DNA contenuti e proteine di proliferazione associate quali ciclina D, ciclina E, ciclina A, o ciclina B1 vs contenuto di DNA. Quest'approccio permette di distinguere, per esempio, cellule in fase G0 da cellule in fase G1, identificare le cellule in mitosi, o ricerca dell'espressione di altre proteine capaci d'indicarci una fase del ciclo cellulare. Il quarto caso si basa sulla rilevazione di 5'-bromo-2'-deossipuridina (BrdU). Quest'ultima ci indica la quantità di cellule in divisione in quanto è utilizzata dalle cellule come analogo strutturale della timidina [31].

I test metabolici per saggiare la vitalità cellulare hanno guadagnato nel corso degli anni sempre più attenzione come alternativa possibile all'utilizzo di animali. Sono impiegati negli screening della citotossicità di un gran numero di prodotti chimici su diversi modelli cellulari, in chemioterapia per la selezione di farmaci anti-cancro e per determinare le dosi efficaci. I test per la vitalità cellulare sono validi sostituti and del test di captazione di [H^3] timidina. Questo è un metodo conosciuto per la valutazione della proliferazione cellulare, ma richiede locali ed apparecchiature adatte e produce rifiuti radioattivi.

Il capostipite dei test metabolici impiegato per saggiare la vitalità cellulare è *MTT assay*. Questo test è basato sulla capacità che cellule vitali e metabolicamente attive possiedono di ridurre il bromuro di tetrazolio, sale giallo e solubile in acqua, ad un composto violaceo ed apolare chiamato formazan [32-34]; sono le reduttasi cellulari che catalizzano questa reazione. Il bromuro di tetrazolio è facilmente assorbito dalle cellule ed il formazan si accumula in granuli citoplasmatici in seguito eliminato tramite escitosi, che produce caratteristici aggregati aghiformi sulla superficie cellulare [35]. La produzione di formazan dovrebbe esser direttamente proporzionale alla quantità di cellule metabolicamente attive [32]. Il formazan viene quantificato spettrofotometricamente, solo dopo esser solubilizzato utilizzando solventi organici [36]. La conversione di bromuro di tetrazolio a formazan, compiuta dai mitocondri metabolicamente attivi, è stato utilizzato come test di

proliferazione cellulare e di citotossicità [37]. In realtà la riduzione non è solo associata ai mitocondri, ma anche con il citoplasma e con le membrane degli endosomi/lisosomi e la membrana plasmatica. La carica positiva netta di sali di tetrazolio come MTT e NBT sembra essere il fattore predominante coinvolto nel loro assorbimento cellulare tramite il potenziale di membrana plasmatica [38].

I Sali di Tetrazolio sono accettori di elettroni da parte di sostanze riducenti, o coenzimi tra cui NADH e NADPH, che possono tradurre la loro riduzione nella formazione di formazan. L'uso dell'MTT *assay* è basato sull'assunzione che questo colorante sia ridotto a formazan esclusivamente dal sistema della succinato deidrogenasi mitocondriale. Diversi autori mostrano come questo sia vero solo in parte e come sia necessario un uso critico del MTT *assay*, come del resto di tutti i test metabolici simili.

Chakrabarti *et al.*, osserva parte della formazione di formazan anche in alcuni, ma non in tutti, terreni di coltura in assenza di qualsiasi sistema vivente. Ciò indica che alcuni componenti del terreno di coltura potrebbero reagire con MTT riducendolo a formazan, come potrebbero fare le reduttasi mitocondriali. Ulteriori studi hanno rivelato che l'acido ascorbico può ridurre l'MTT a formazan. Il potenziale riduttivo dell'acido ascorbico è profondamente aumentato dalla presenza, seppur in quantità molto piccole, di retinolo; il solo retinolo non ha avuto effetto. Sembra quasi che il retinolo funga da catalizzatore (reduttasi) del bromuro di tetrazolio a formazan, utilizzando Vitamina C come riducente (antiossidante). Belyanskaya *et al.*, come altri autori analizzano hanno evidenziato che SWCNTs e altri materiali a base di carbonio interferiscono con coloranti su cui si basano i test di citotossicità, inclusi il bromuro di tetrazolio ed il 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolio (WST-1) [36]. A seguito degli studi citati si è deciso di valutare preliminarmente se il K:D-rib interagisse con il bromuro di tetrazolio. In accordo con il protocollo di *Franken* si è valutato anche il potenziale clonogenico della linea Hs 578T e come questo potesse cambiare in relazione al trattamento con K:D-rib. La capacità di generare colonie, per le cellule tumorale, è un aspetto piuttosto intrigante della proliferazione cellulare. Si misura la capacità di una singola cellula di generare una colonia, gruppo di cellula di almeno 50 unità.

Avendo a disposizione anche il modello cellulare non tumorale, linea cellulare Hs 578Bst, si è valutato se K.D-rib mostrasse qualche effetto. Lo studio è stato condotto utilizzando il numero di *split*; ancora una volta non si sono impiegati test metabolici per il motivo precedente.

2.6.2 Azione su capacità chemoinvasiva

L'azione chemoinvasiva, come descritto del paragrafo degli "*hallmarks*" è un aspetto fondamentale delle neoplasie. La malignità di un tumore la possiamo definire come capacità d'invadere i tessuti

circostanti, intravasare, extravasare e in seguito creare foci tumorali più o meno distanti dal sito di formazione del tumore primario, generando quindi metastasi. Negli ultimi vent'anni circa è nata l'esigenza di fornire ai ricercatori una possibilità di studio *in vitro* di diversi step o "hallmarks" che portano alla genesi della metastasi, dal tumore primario. Questo è stato possibile perché dal fenomeno "genesi neoplastica e metastatizzazione" si sono estrapolati i singoli aspetti e si sono potuti studiare individualmente.

Il processo d'invasione e metastatizzazione è molto complesso e processo che richiede ad una cellula tumorale di modulare la capacità di adesione, degradazione della matrice extracellulare circostante, migrazione e proliferazione in un distretto differente dal primario ed infine, i tumori devono anche stimolare l'angiogenesi e raggiungere dimensioni macroscopiche. Instabilità genetica favorisce l'acquisizione di una capacità di crescita incontrollata, la fuga dai meccanismi di controllo e molto spesso compare la resistenza ai trattamenti farmacologici. A parte l'evento trasformante iniziale, i fattori che entrano in gioco nel tumore sono clinicamente rilevanti. L'infiammazione è una caratteristica comune e potenzialmente chiave della maggior parte dei tumori, come la neo-vascularizzazione che permette un aumento delle dimensioni del tumore primario. In seguito ai segnali di mutazione/promozione neoplastica le cellule casualmente si staccano dal tumore primario e s'immettono attraverso il sangue o vasi linfatici. Questo è seguito dall'adesione all'endotelio ed il risultato finale è la penetrazione in un nuovo tessuto. Nel migliorare gli strumenti per effettuare questi studi/saggi, si è potuto inserire sempre più variabili, in modo tale da rendere sempre minore l'approssimazione del fenomeno e sempre più vicino a ciò che accade *in vivo*. Ci si è potuti spingere sempre più verso substrati di migrazione ed invasione simili alla matrice extracellulare e l'utilizzo delle cellule endoteliali ha permesso di saggiare quello che è effettivamente il potenziale maligno. Queste cellule hanno permesso di mimare *in vitro* ciò che potrebbe accadere durante il raggiungimento del sistema circolatorio e l'uscita da questo [39, 40].

Dei numerosi saggi di chemotassi attualmente disponibili, come migrazione cellulare attraverso supporti permeabili, rappresentano un scelta piuttosto popolare (ad esempio, la camera di *Boyden*). Oppure altri saggi permettono l'analisi del *cell crawling* mediante l'utilizzo di un coprioggetto (ad esempio, la camera di *Dunn*).

L'uso di agarosio come mezzo attraverso il quale le cellule possono diffondersi, mediante l'utilizzo di un chemoattrattore, ha fornito un sistema semplice e diretto per lo studio della motilità cellulare e del potenziale invasivo [40]. Questo saggio poco costoso e semplice da allestire ed ha permesso per la linea cellulare Hs-578T, carcinoma mammario umano, lo studio sia del potenziale invasivo che di quello migratorio. In un secondo momento ha permesso di verificare se queste due caratteristiche erano modificate dal trattamento con K:D-rib a diverse concentrazioni ed a tempi diversi.

2.6.3 Morfologia

La cellula maligna è caratterizzata da diversi cambiamenti biologici, se paragonata ad una cellula non tumorale. Tra questi compaiono anche cambiamenti morfologici. Talvolta alcune classificazioni istologiche partono dalla morfologia cellulare. Morfologicamente, la cellula cancerosa è caratterizzata da un rapporto nucleo/citoplasma diverso rispetto ad una cellula non tumorale. È presente un nucleo più grande, avente una dimensione e forma irregolare. I nucleoli sono prominenti, il citoplasma è scarso e intensamente colorato oppure è molto meno colorato. Talvolta il nucleo viene preso come marker morfologico di malignità. Cambiamenti nucleari spiegano la presenza di diversi cloni cellulari e anomalie genetiche associate con questi cambiamenti. Queste caratteristiche morfologiche riflettono i cambiamenti che si verificano a livello metabolico in una cellula tumorale. Il citoplasma subisce modificazioni con la comparsa di nuove strutture, come un accumulo di rRNA e di mRNA. Le cellule maligne hanno una piccola quantità citoplasmatica fortemente vacuolata. Il reticolo endoplasmatico rugoso ha un aspetto diverso rispetto a quello presente in cellule non tumorali. Amorfo, granuloso, ricco di materiale filamentoso può accumularsi in cisterne. Frammentazione e degranulazione si trovano di frequentemente, con l'interruzione del collegamento tra il reticolo endoplasmatico rugoso e mitocondri. La diminuzione del reticolo endoplasmatico rugoso e la sua modificazione strutturale durante la formazione neoplastica avviene in concomitanza con un aumento di ribosomi liberi e polisomi (ribosomi uniti assieme), che mostra una maggiore produzione di proteine necessarie per il processo di crescita cellulare. L'apparato di Golgi nelle cellule maligne è generalmente poco sviluppato, il che comporta una correlazione con la mancanza di differenziazione delle cellule tumorali. Le cellule che hanno perso differenziazione, presentano solo occasionalmente l'apparato di Golgi. I mitocondri, durante il processo neoplastico, diminuiscono di dimensioni mostrando un'elevata variabilità di forma e volume. La distribuzione longitudinale dei mitocondri comporta un'insufficiente citocromo ossidasi.

Microfilamenti, filamenti intermedi e microtubuli appaiono in quantità diverse in cellule maligne. La capacità d'invasione e metastasi della cellula cancerosa, dipende dal potenziale migratorio correlato al contenuto actina. Carcinomi epiteliali contengono citocheratine, tumori mesenchimali contengono vimentina, e nelle cellule del sistema nervoso centrale è una proteina acida da fibre gliali, con un ruolo particolare nella diagnosi dei tumori. Agenti citostatici agiscono sulla depolimerizzazione dei microtubuli cellulari tumorali che culminano con l'inibizione della metastatizzazione, mitosi e la crescita tumorale. La membrana cellulare svolge un ruolo molto importante nel processo neoplastico. Cambiamenti molecolari superficiali sono in grado d'influenzare l'evoluzione maligna. Un aumento o diminuzione del numero di recettori di superficie

possono interferire con i meccanismi di regolazione. Mutazioni strutturali di proteine o recettori di superficie possono interagire maggiormente più con il ligando oppure lo stesso effetto lo si può avere se è il ligando ad esser mutato. Le cellule maligne cambiano il loro contenuto di enzimi, quali la riduzione della fosfatasi acida o alcalina. Si verificano cambiamenti nel rapporto tra zuccheri e l'acido sialico da glicolipidi e glicoproteine, ed una depolarizzazione della membrana. La membrana plasmatica della cellula maligna favorisce il trasporto accelerato di sostanze nutritive, in particolare zuccheri e amminoacidi. La superficie di cellule maligne mostra antigeni di differenziazione che esprimono un normale sviluppo della cellula cancerosa e antigeni specifici per il tumore, che appaiono con la trasformazione neoplastica, dalla variazione del programma genetico della cellula. Sulla superficie cellulare vi sono proteasi di superficie specifiche responsabili della capacità litica e che possono conferire un aumento della migrazione. Perdendo l'inibizione da contatto, le cellule tumorali acquisiscono anche l'autonomia metabolica, sia la loro proliferazione e il movimento di essere favorita. Sulla superficie delle cellule maligne possiamo trovare una concentrazione ed una morfologia atipica dei microvilli, pseudopodi e strutture che possono favorire la migrazione cellulare. Un tipo istologico specifico di carcinoma a cellule squamose è il carcinoma a cellule fusiformi. È indicato anche come pseudosarcoma o carcinosarcoma. Le cellule fusiformi sono sottili, allungate ed infiltrano il tessuto stromale. Si possono trovare sia come singole cellule, come cordoni di cellule piuttosto che come gruppi o isole. Carcinoma a cellule fusiformi è stato trovato in molti tipi di cancro diversi ed è associato ad una brutta prognosi nei tumori della cavità orale, esofago e polmone. Cellule neoplastiche epiteliali fusiformi hanno perso le loro caratteristiche tipiche epiteliali e sembrano acquisire la capacità di infiltrarsi nello stroma sottostante e metastatizzare [41].

In accordo con ciò che è stato qui riportato, con questo studio si è scelto di analizzare la morfologia delle cellule di carcinoma mammario umano (Hs-578T) prima e dopo il trattamento con K:D-rib, valutando se vi fossero cambiamenti morfologici in accordo con i cambiamenti di proliferazione cellulare e potenziale invasivo. La morfologia cellulare è stata studiata tramite la microscopia a forza atomica (AFM). Inoltre si è voluto verificare se il trattamento potesse indurre la formazione di strutture necessarie alla cellula per una maggior adesione al substrato oppure se il trattamento interferisse con la formazione di queste strutture.

2.6.4 Potere protettivo ed azione antiossidante

Un aspetto da considerare riguardante il K:D-rib è il potere antiossidante. Questo lo si potrebbe pensare in termini protettivi contro lo stress ossidativo che è alla base di molte patologie, sindromi, terapie ed in parte derivante anche dal metabolismo cellulare. Uno studio precedente a questo ha

dimostrato il forte effetto antiossidante di ascorbato di potassio (KAsc) sull'ossidazione dei globuli rossi. In questo studio s'induceva un forte stress ossidativo in globuli rossi. Si è visto che trattando gli eritrociti con un forte ossidante acetilfenilidrazina (APH) ed incubandolo con KAsc, l'effetto del potente ossidante era significativamente ridotto. Sembra che l'acido ascorbico, interagendo con il KHCO_3 , traghetti il K^+ all'interno degli eritrociti [42].

Uno studio condotto su bambini affetti dalla sindrome di Costello, se trattati con PAR (D-ribosio, bicarbonato di potassio ed acido ascorbico) mostrano un miglioramento delle loro condizioni, già anche dopo una somministrazione di PAR, come fosse un integratore vitaminico. Un follow-up impostato secondo un programma di gestione della sindrome Costello, ha mostrato un netto miglioramento del quadro clinico del paziente. C'è stato un miglioramento della pelle, una migliore evoluzione psicomotoria, arresto di progressione dell'ipertrofia cardiaca e nessun sviluppo di neoplasie; essendo la sindrome di Costello una sindrome ad alto sviluppo oncologico. Gli autori ipotizzano un effetto protettivo contro lo stress ossidativo, essendo PAR un antiossidante. Si sono confrontati i valori di biomarcatori dello stress ossidativo trovati dopo la somministrazione PAR con un campione non trattato ed è stata vista una riduzione dei biomarcatori dello stress ossidativo, anche per pazienti con sindromi ad alto rischio oncologico come la sindrome di Beckwith-Wiedemann [43]. In un altro studio condotto su una paziente con sindrome di Prader Willi, sono emersi effetti positivi dovuti al trattamento con PAR. Sembra dare effetti davvero molto promettenti, sotto l'aspetto clinico. C'è anche in questo caso una riduzione dello stress ossidativo con la mancata obesità, aspetto che contraddistingue questi pazienti [44].

Recentemente sono stati pubblicati dati in cui, tramite spettroscopia UV/VIS, si dimostra l'interazione tra il bromuro di tetrazolio ed il K:D-rib, anche a basse concentrazioni. Il K:D-rib mostra un comportamento analogo all'acido ascorbico ed al KAsc. Spontaneamente l'acido ascorbico riduce il bromuro di tetrazolio a formazan quanto riduce molti composti così come H_2O_2 e Citocromo *c* [34]. Per analogia, possiamo affermare che il K:D-rib mostra un potere antiossidante e come tale potrebbe espletare un effetto protettivo nei confronti di stress ossidativi [1, 34].

Queste evidenze sperimentali ci hanno indotto a valutare l'effetto protettivo del K:D-rib nei confronti della linea cellulare Hs-578Bst (epitelio mammario umano non tumorale) irraggiata con due dosi da 2Gy di raggi-X, mimando una seduta di radioterapia convenzionale. Le radiazioni ionizzanti agiscono inducendo stress ossidativi diretti verso i target biologici quali le cellule tumorali. La ionizzazione può avvenire direttamente sul target biologico, oppure indirettamente generando radicali liberi attraverso la ionizzazione di molecole radiosensibili quali acqua ed ossigeno. Vogliamo valutare l'effetto protettivo del K:D-rib nei confronti della porzione di tessuto stromale circostante la massa tumorale irraggiata. Ci concentreremo sul danno perossidico alla

membrana cellulare ed alle porzioni citoscheletriche direttamente connesse con essa. L'analisi del danno verrà condotta analizzando la morfologia tramite AFM.

2.6.5 Uptake K:D-rib

Un quesito che ci si è posto è se vi fosse in un qualche modo un *uptake* del K:D-rib; più precisamente *uptake* dello ione potassio. Per rispondere a questa domanda si è utilizzato il DNAzima come biosensore di ioni potassio. Il DNAzima è un enzima a DNA, e come tale è in grado di catalizzare le reazioni chimiche grazie alla sua attività perossidasi. Questo è formato da emina e G-quadruplex. L'emina, con l'atomo di Fe, costituisce la parte catalitica della molecola ed il G-quadruplex che costituisce l'apoenzima [45-47]. Alcuni aptameri (acidi nucleici artificiali) sono noti per avere motivi G-quadruplex che possono legare l'emina. Tra questi compaiono PS5.2M e PS2.M [47]. Altri G-quadruplex non sintetici, thrombin binding aptamer (TA, 15-mer), AGRO 100 e le sequenze telomeriche umane, è stato dimostrato abbiano un'intrinseca debole attività perossidasi. Si è recentemente osservato che alcuni motivi a G-quadruplex sono presenti in sequenze promotrici e possono complessare l'emina formando DNAzima. Il DNAzima, dal punto di vista catalitico, come descritto prima, è una perossidasi. È in grado di catalizzare l'ossidazione del 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) grazie alla presenza di H₂O₂, ad ABTS⁺ ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$, $\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Confrontato con le proteine tradizionali, il DNAzima mostra diversi vantaggi: stabilità chimica, basso costo, sintesi relativamente semplice e di facile modificazione [48].

Il G-quadruplex è stato foldato in presenza di ioni potassio derivanti dal surnatante delle cellule tumorali trattate e non trattate. In questo modo l'apoenzima ha un'affinità molto alta per l'emina garantendo la formazione del DNAzima, rilevabile attraverso spettroscopia UV-VIS. Al momento si sta cercando di utilizzare i soli G-quadruplex come biosensori di potassio, in quanto la parte del DNAzima che realmente interagisce con il potassio sono le sequenze oligonucleotidiche. Queste conformazioni possono essere studiate seguendone il folding tramite spettroscopia CD. Il G-quadruplex sembra esser un sistema altrettanto interessante come biosensore, ma ha il vantaggio d'esser più semplice rispetto al DNAzima perché non ha l'emina.

3 MATERIALI E METODI

3.1 LA SOLUZIONE K:D-rib

K:D-rib è l'acronimo della soluzione acquosa composta da D-ribosio (Sigma Aldrich) e KHCO_3 (BDH Prolabo). Questa è ottenuta mescolando 150 mg di D-ribosio e 300 mg di KHCO_3 in 4 ml d'acqua distillata, così da ottenere una soluzione stock di 250 mM, rispettando un rapporto stechiometrico tra D-ribosio e KHCO_3 di 1 : 3.

3.2 COLTURE CELLULARI

Hs 578T (HTB-126) è una linea cellulare di carcinoma mammario umano con crescita in adesione (ATCC - partnership LGC standard). Le cellule sono mantenute in DMEM (low glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Lonza) con aggiunta di: FBS al 10% (siero fetale bovino - Lonza) in precedenza scomplementato per 20' a 56°C, L-Glutamina (Lonza), Penicillina/streptomina (Lonza) al 1% sul volume finale. La scomplementazione va ad inattivare le proteine che si attivano durante la cascata del complemento.

Hs 578Bst (HTB-125) linea cellulare derivante da epitelio mammario umano non tumorale con crescita in adesione, è stata stabilizzata dalla stessa paziente dalla quale è stata stabilizzata la linea Hs 578T. Anche questa linea cellulare è stata acquistata da ATCC - partnership LGC standard. La linea Hs578Bst proveniva dalla porzione periferica alla regione tumorale. La linea non tumorale è mantenuta in Hybri-Care Medium (ATCC - partnership LGC standard) con aggiunta di 1.5mg/l di NaHCO_3 (Sigma), 30ng/ml di EGF (Invitrogen), FBS al 10% (siero fetale bovino) precedentemente scomplementato e Penicillina/streptomina al 1% sul volume finale. Entrambe le linee cellulari sono mantenute in incubatore a 37°C ed in atmosfera umidificata con CO_2 al 5%. Per entrambe le linee cellulari il cambio mezzo avviene ogni 48-72 h ed una volta raggiunta la confluenza del 90-100% la coltura viene "splittata" portandola alla minor concentrazione desiderata. Con split intendiamo la diluizione (letteralmente divisione) di una cultura cellulare a confluenza, ossia ad alta concentrazione, ad una a concentrazione inferiore. Affinché lo split possa avvenire è necessario staccare le cellule dalla Petri di crescita (Sarsted), "clivando" le connessioni cellula-cellula e cellula-fondo della Petri. Questo è possibile utilizzando la tripsina (Lonza) come enzima proteolitico aspecifico, responsabile del "clivaggio" di queste connessioni di natura proteica.

3.3 ESPERIMENTI DI BIOLOGIA CELLULARE

Di seguito sono riportati gli esperimenti svolti per studiare gli effetti del K:D-rib sulla proliferazione delle cellule tumorali Hs 578T e non tumorali Hs 578Bst. Per valutare la proliferazione delle cellule tumorali si sono utilizzati: **il numero di split** fino a 40 giorni di trattamento, **il conteggio delle cellule** mantenute in trattamento per 12 giorni, fissate con paraformaldeide (PFA) (Bio-optica) colorate con Giemsa (Fluka) ed il **clonogenic assay**. La concentrazione di KHCO_3 è 15mM perché il rapporto stechiometrico fra D-ribosio e KHCO_3 nel K:D-rib è di 1 : 3

Gli effetti del K:D-rib sulla tumorigenicità della linea Hs 578T sono stati investigati attraverso il **saggio di chemoinvasione** (Wiggins and Rappoport, 2010).

Per quanto riguarda la linea cellulare non tumorale Hs 578Bst l'effetto del K:D-rib sulla proliferazione è stato saggiato attraverso il **numero degli split**. Con lo stesso metodo si sono valutati anche gli effetti dei singoli componenti del K:D-rib che sono D-ribosio e KHCO_3 .

3.3.1 Numero di split linea Hs 578T

La linea cellulare Hs 578T - carcinoma mammario umano - è stata seminata ad una concentrazione di 10000cell/ml, in Petri da 35 mm di diametro. Le cellule sono mantenute in trattamento per 50 giorni e l'effetto del K:D-rib 5 mM è stato saggiato attraverso il numero di split. Con split intendiamo il rinfresco o diluizione di una cultura cellulare quando arriva ad una confluenza di circa il 90 % - 100 %; 1:2 è la diluizione a cui lo split viene fatto.

3.3.2 Curve di crescita cellulare linea Hs 578T

Riguardo la linea cellulare Hs 578T due metodi si sono utilizzati per le curve di crescita.

Metodo 1. La linea cellulare Hs 578T è stata seminata alla concentrazione di 20.000 cell/ml in piastra a quattro pozzetti, seminando un volume di sospensione cellulare di 500 μl . Il trattamento è durato 96h con K:D-rib alla concentrazione di 5 mM. Ogni 24 h le cellule sono state fissate con PFA al 4%, e colorate con Giemsa. Si è fotografato tutto il pozzetto e successivamente tutte le cellule sono state contate.

Metodo 2. La linea cellulare tumorale Hs 578T è stata seminata ad una concentrazione di 4000 cell/ml, trattata con K:D-rib 5mM per 14 giorni ed il mezzo è stato cambiato ogni 48 – 72 h, in accordo con il protocollo di mantenimento delle linee cellulari. Ogni 48h una Petri di controllo ed una con le cellule trattate sono state fissate con PFA 4% e colorate con Giemsa. Si sono selezionati

dei campi lungo le perpendicolari delle Petri, come mostrato in figura 3.1 tali campi sono stati fotografati e le cellule contate.

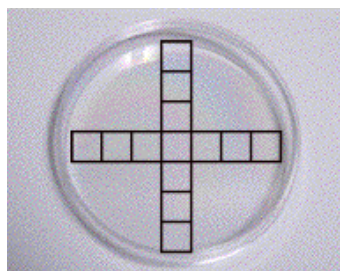


Figura 3.1: Illustrazione dei campi fotografati nel metodo 2.

Per le conte delle cellule sia nel caso del metodo 1 che nel caso del metodo 2 ci si è avvalsi di alcuni *plugin* del *software* ImageJ. Le immagini delle cellule colorate con GIMSA sono convertite da color (8 bit) a *gray scale* (8 bit) e si è quindi scelta una soglia (*Threshold*) grazie alla quale tutti i pixel in un certo range di intensità sono assegnati ad un solo colore (rosso) e tutti gli altri al colore (bianco), come mostrato in figura 3.2 A questo punto le zone colorate sono contate tramite il *Plugin* “*Analyze Particle*” e i valori trovati controllati manualmente.

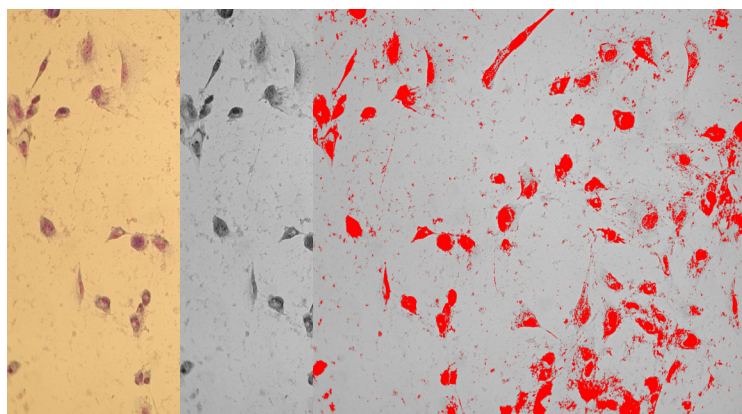


Figura3.2: esempio di utilizzo del software ImageJ per il conteggio delle cellule presenti in un immagine

3.3.3 Curve di crescita cellulare linea Hs 578Bst

Per lo studio dell'effetto del K:D-rib sulla proliferazione della linea cellulare Hs 578Bst - epitelio mammario umano non tumorale - le cellule sono state seminate alla concentrazione di 4000 cell/ml, mantenuta in trattamento per 25 giorni con K:D-rib alla concentrazione di 5mM. Il mezzo è stato cambiato ogni 48 – 72 h e gli split sono avvenuti una volta raggiunta una confluenza del 90 – 100 % in accordo con l'esperimento sulla linea Hs 578T. Per lo studio delle componenti separate la linea cellulare è stata seminata ad una concentrazione di 4000 cell/ml ed è stata mantenuta in coltura per

18 giorni. Le cellule sono state trattate con D-ribosio 5mM, KHCO_3 15mM e K:D-rib 5mM. La concentrazione di KHCO_3 è 15mM perché il rapporto stechiometrico fra D-ribosio e KHCO_3 nel K:D-rib è di 1:3.

3.3.4 Clonogenic assay

Questo esperimento di proliferazione cellulare è stato condotto in accordo con il protocollo pubblicato sulla rivista Nature Protocols (Franken et al., 2006). La linea cellulare Hs 578T è stata seminata alla concentrazione di 25 cell/ml in petri da 35 mm di diametro. Dopo 24h, tempo sufficiente per ottenere un'adesione delle cellule alla petri, si è iniziato il trattamento con K:D-rib a diverse concentrazioni: 5 mM, 10 mM e 15 mM. L'esperimento si è protratto per 21 giorni ed i cambi mezzi sono stati fatti una volta alla settimana, mantenendo così il trattamento per tutta la durata dell'esperimento. Al termine le cellule sono state fissate con PFA 4% (Bio-optica) e colorate con colorante Giemsa (Fluka). Le colonie sono state poi osservate al microscopio e contate. Sono definite come colonie i gruppi di cellule costituite da almeno 50 unità.

3.3.5 Saggio di chemoinvasione

Questo saggio è stato eseguito in accordo con il protocollo di Wiggins (Wiggins and Rappoport, 2010). 0.05g di agarosio a basso punto di fusione (Sigma Aldrich) è stato diluito in 10 ml di PBS per ottenere una soluzione di agar allo 0,5%. È stato riscaldato fino ad ebollizione, agitato per ottenere una completa dissoluzione, poi autoclavato. A 90 μ l di agarosio liquido sono stati aggiunti 10 μ l di FBS (AGAR-FBS), siero fetale bovino utilizzato come chemoattrattore. Due coverslips di 12 millimetri di diametro cottate con poli-L-lisina, sono state fatte aderire in una piastra da 35mm di diametro. 10 μ l di AGAR-FBS (controllo positivo) e 10 μ l di solo AGAR (controllo negativo) sono stati depositati sui coverslips. Le petri sono state lasciate 30 minuti a 4°C, per ottenere una giusta solidificazione dell'agar, prima di effettuare il saggio. Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 10000 cell/ml e pre-trattate con K:D-rib 5 mM per tempi diversi: 3, 5 e 7 giorni. Alla fine di ogni pre-trattamento, 20000 cellule/ml sono state seminate nella piastra contenente i due coverslips di cui uno con solo lo spot di AGAR e l'altro con lo spot di AGAR-FBS. Durante il saggio, della durata di 48h, il trattamento è stato mantenuto ed ai tempi di pre-trattamento si sono sommate le 48 ore del saggio. Al termine gli spot d'agar sono stati fotografati e le cellule al loro interno sono state contate.

In un altro esperimento le cellule sono state pre-trattate per 7 giorni, ma durante il saggio (2 giorni) il trattamento è stato sospeso. Anche al termine di questo esperimento gli spot d'agar sono stati fotografati e le cellule al loro interno contate. Per entrambi gli esperimenti le cellule non

completamente all'interno o sullo spot non sono state contate. Per ogni foto il numero di cellule contate è stato diviso per il perimetro dello spot stesso calcolato utilizzando l'opzione *measure* del plugin *analyze* del programma ImageJ.

3.4 ESPERIMENTI UV- VIS

La spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm). L'assorbimento di questi tipi di radiazioni da parte delle molecole è in grado di produrre delle transizioni energetiche degli elettroni esterni della molecole, sia impegnati che non impegnati in un legame.

Questi elettroni possono essere:

- ◆ di tipo sigma (σ), costituiti da una nube elettronica addensata lungo l'asse di unione dei nuclei degli atomi interessati al legame (i legami semplici sono di tipo σ);
- ◆ di tipo pi-greco (π), costituiti da coppie di elettroni la cui maggior densità elettronica è situata al di fuori dell'asse di unione dei nuclei (come accade nei legami doppi o tripli).

Molti composti assorbono la radiazione elettromagnetica nelle regioni del visibile (vis) e dell'ultravioletto (UV). Quando un fascio di luce d'intensità I_0 incide sul campione di spessore $d(\text{cm})$, e concentrazione molare c , l'intensità I_1 dopo l'attraversamento del campione segue la legge empirica di Lambert-Beer:

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-\varepsilon_\lambda dc}$$

dove ε_λ è detto coefficiente di estinzione molare ed è una costante tipica del mezzo attraversato per la lunghezza d'onda λ . In questo caso l'assorbanza A è per definizione:

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_\lambda dc$$

La densità ottica (OD) è un parametro utile poiché è uguale a $c \times \varepsilon$. In alcuni casi quando la concentrazione è alta, ε_λ sembra essere funzione della concentrazione c e in questo caso la legge di Beer è violata. Ci sono vari tipi di "violazione" della legge di Beer, ad esempio all'aumentare della concentrazione per la formazione di dimeri o polimeri, o sempre ad alte concentrazioni, per l'aggregazione che porta allo scattering della luce incidente con una diminuzione della luce trasmessa. La denaturazione delle proteine, anche a basse concentrazioni, può essere un'altra causa della non applicabilità della legge di Beer. Il coefficiente di estinzione molare ε indica il valore di assorbanza del composto in esame quando $[d = 1] \text{ cm}$ e $[c = 1]$, e il suo valore dipende:

- ◆ dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita

- ◆ dalla natura del solvente
- ◆ dal pH
- ◆ dalla specie chimica che assorbe.

Nell'analisi quantitativa spettrofotometrica è fondamentale conoscere come varia l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda. Ciò viene espresso molto chiaramente con il diagramma in cui in ascissa si riportano i valori delle lunghezze d'onda e in ordinata i corrispondenti valori dell'assorbanza. Si ottengono così delle curve (“spettri”) che variano da sostanza a sostanza e presentano dei massimi caratteristici in corrispondenza di alcune lunghezze d'onda (λ_{max}).

Poiché le lunghezze d'onda della luce assorbita dipendono dalle transizioni elettroniche che si verificano effettivamente (ed essendo la distribuzione elettronica diversa per i vari atomi), i picchi di assorbimento specifici possono essere correlati a sottostrutture molecolari note, cioè ai cromofori presenti nella struttura della molecola. Il cromoforo è quindi una parte specifica della molecola che dà origine a parti distinte dello spettro di assorbimento.

Nell'analisi quantitativa lo spettro è essenziale per la scelta della lunghezza d'onda più appropriata da utilizzare, che corrisponde alla λ_{max} di un cromoforo caratteristico della molecola.

Nelle misure riportate sono stati utilizzati due spettrofotometri UV/VIS, il Varian Cary 400 e il Jasco V630 entrambi a doppio raggio. Con entrambi gli strumenti le misure sono state fatte a temperatura ambiente.

Qui di seguito saranno indicati i protocolli delle misure di ottica per studiare la struttura del **K:D-rib**; l'interazione tra **MTT** e **K:D-rib** e la **formazione del DNAzima**.

3.4.1 Campioni K:D-rib - misure UV-VIS

Il K:D-rib è una soluzione semplice, la cui interazione chimica tra i componenti non è nota. In questo lavoro di tesi si cerca anche d'indagare se l'azione del composto sia interna o esterna alla cellula, di capire se il K:D-rib agisca per sinergismo dei singoli componenti che agiscono separatamente, oppure se si forma un composto “debole”. Al fine di indagare questi aspetti si è deciso di misurare l'assorbanza del K:D-rib e dei singoli componenti in soluzione acquosa tramite spettroscopia UV-VIS. I campioni misurati sono: la soluzione acquosa di D-ribosio 500 mM (D-rib), la soluzione acquosa di KHCO_3 500 mM (KHCO_3) e quella di K:D-rib 500 mM (K:D-rib 500 mM). I campioni sono stati misurati nel range 200 nm – 700 nm e con un intervallo di 1 nm e una velocità di scansione di 600 nm/min. Gli spettri di assorbimento sono stati misurati a temperatura ambiente (RT) dopo un'incubazione per 4 ore a 37 °C. L'acqua distillata è stata utilizzata come baseline e come “reference” sul secondo fascio dello spettrofotometro.

3.4.2 Campioni MTT e K:D-rib - misure UV-VIS

Si sono analizzate tramite spettroscopia UV-VIS le possibili interazioni tra bromuro di tetrazolio e del K:D-rib. Quando si vuole studiare l'attività metabolica di una popolazione cellulare, direttamente connessa con la vitalità, si utilizzano test come MTT, XTT, WST-1 ecc. Questo test sfrutta l'attività reduttasica di enzimi presenti in cellule metabolicamente attive. Spesso si fa riferimento alle reduttasi mitocondriali, ma è stato visto che il bromuro di tetrazolio può essere ridotto a Formazan anche nel citoplasma di cellule metabolicamente attive.

Le diluizioni di K:D-rib testate sono state fatte in Petri come per l'attività metabolica cellulare, ma in assenza di cellule. Il mezzo utilizzato è il DMEM bianco senza rosso fenolo (Lonza) perché l'assorbimento nella regione UV-VIS del rosso fenolo, colorante presente nel DMEM ed indicatore di pH del terreno, interferisce con le misure d'assorbimento UV-VIS.

La reazione è stata fatta avvenire in accordo con il protocollo dell'MTT *assay (ref)* ed i campioni sono stati misurati, in modo del tutto simile al protocollo con le cellule. I campioni sono stati così preparati. 0.2 ml di soluzione contenente il bromuro di tetrazolio sono stati aggiunti a 1.8 ml di DMEM bianco contenente K:D-rib alle concentrazioni 150 mM, 75 mM, 15 mM, 10 mM, 5mM ed 1,5 mM partendo da una soluzione stock di 250 mM (3.1). Dopo 4 ore a 37° C, ai campioni sono stati aggiunti 2 µl di SDS 10% (Sigma) che si è lasciato agire per una notte, tempo necessario affinché i cristalli di formazan siano completamente solubilizzati dal SDS. È stato preparato anche un campione di riferimento (reference) con 0.2 ml di soluzione contenente bromuro di tetrazolio, 1.8 ml di solo DMEM e 2 µl di SDS 10% (Sigma).

Sono stati quindi preparati sette campioni indicati come MTT, 150 mM K:D-rib, 75 mM K:D-rib, 15 mM K:D-rib, 10 mM K:D-rib, 5 mM K:D-rib e analizzati mediante spettroscopia UV-VIS. Lo spettro del campione di riferimento è stato opportunamente sottratto agli spettri dei campioni 150 mM K:D-rib, 75 mM K:D-rib, 15 mM K:D-rib, 10 mM K:D-rib e 5mM K:D-rib. Si è misurata l'assorbanza della soluzione da 400 nm fino a 720 nm. Tutti i campioni sono stati misurati a temperatura ambiente.

3.4.3 DNAzima – misure UV-VIS

Di seguito è riportato il protocollo di folding dei G-quadruplex e di formazione del DNAzima. Questo protocollo è una variazione del protocollo utilizzato da (Travascio et al., 1998) La sequenza utilizzata è la PS5.M 5'-GTGGGTCATTGTGGGTGGGTGTGG-3' (Tema Ricerca). La sequenza è stata ricostituita in tampone TE composto da: 10 mM Tris (Sigma) pH 7,5 e 0,1 mM EDTA (Sigma). La soluzione con il PS5.M è stata conservata a -20°C alla concentrazione di 500 µM Tale

concentrazione è stata verificata tramite misurando l'assorbanza a 254,4 nm, a questa lunghezza d'onda il coefficiente d'estinzione molare ϵ è di 242428,7 l/mol*cm. Si tratta di un oligonucleotide sintetico identificato avere affinità per l'emina, solo dopo esser foldato in G-quadruplex, attraverso un metodo chiamato SELEX o *in vitro selection* (Travascio et al., 1998). PS5.M è stato quindi scongelato partendo dalla soluzione stock di 500 μ M che è stata riscaldata a 95°C per 5' e lasciata raffreddare a temperatura ambiente. Il DNA è stato diluito ad una concentrazione finale di 1,5 μ M utilizzando il buffer di spettroscopia: 50 mM MES (Sigma) pH 6,2; 100mM Tris (Sigma) acetato, DMSO (Sigma) 1% [v / v] e Triton X-100 (Sigma) 5% [w / v]. Il folding del G-quadruplex è avvenuto in presenza dello ione K^+ aggiunto al buffer di spettroscopia.

Il protocollo di (Travascio et al., 1998) prevedeva un buffer di spettroscopia con concentrazione di KAC pari a 40 mM. Si è dovuto quindi verificare che a concentrazioni minori e con un composto diverso, nel nostro caso il K:D-rib, gli oligonucleotidi si potessero ugualmente foldare in G-quadruplex.

Si sono così utilizzate le seguenti soluzioni contenenti potassio: K:D-rib 5mM, surnatante della linea cellulare tumorale Hs 578T, surnatante della linea cellulare tumorale linea Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM, DMEM bianco e DMEM bianco trattato con K:D-rib 5mM (Paragrafo 3.3.1).

K:D-rib 5mM. Soluzione acquosa alla concentrazione 5mM come descritta nel paragrafo 3.1

Surnatante della linea cellulare tumorale Hs 578T. E' stato prelevato il surnatante della linea cellulare Hs 578T seminata alla concentrazione di 10.000 cell/ml in Petri da 35 mm di diametro mantenuta per 48 h in incubatore a 37°C. Il mezzo di coltura utilizzato è DMEM bianco (Lonza), senza rosso fenolo.Surnatante della linea cellulare tumorale linea Hs 578T trattata con K:D-Rib. E' stato prelevato il surnatante della linea cellulare Hs 578T seminata alla concentrazione di 10.000 cell/ml in Petri da 35 mm di diametro. Le cellule sono state trattate con K:D-rib alla concentrazione di 5 mM per 48h e mantenuta in incubatore a 37°C. Il mezzo di coltura utilizzato è DMEM bianco (Lonza), senza rosso fenolo.DMEM bianco. DMEM bianco incubato a 37 °C per 48 h.

DMEM bianco trattato con K:D-rib. DMEM bianco con K:D-rib alla concentrazione di 5 mM incubato a 37 °C per 48 h.

0.5ml di ognuna di queste soluzioni, sono stati aggiunti al buffer di spettroscopia.

La soluzione è lasciata per 30 minuti a temperatura ambiente, per consentire il corretto folding dei G-quadruplex. Il DNAzima, come descritto nell'introduzione, è formato da G-quadruplex (apoenzima) ed emina (porzione catalitica) [1]. L'emina in polvere (Sigma Aldrich) è stata sciolta in DMSO e ricostituita in una soluzione stock alla concentrazione di 2,5 mM. In seguito la soluzione stock 5mM è stata diluita alla concentrazione di 100 μ M. Ogni singola diluizione è stata controllata misurando l'assorbanza della soluzione tramite spettroscopia UV-VIS. La

quantificazione delle concentrazioni e le diluizioni sono state effettuate nel tampone di spettroscopia (MES 50 mM, pH 6,2; 100mM Tris acetato, DMSO 1% [v / v] e Triton X-100 0,05% w/v), denominato K0. Il coefficiente d'estinzione molare dell'emina al 0.05% w/v a 398 nm = $8.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1]. L'emina viene aggiunta ai G-quadruplex per ottenere una concentrazione finale di 0.5 μM . Emina e G-quadruplex sono lasciati per 20 minuti a temperatura ambiente

I cinque campioni ottenuti - K:D-rib 5mM, surnatante (pH = 7.5), surnatante_K:D-rib 5mM (pH=7.7), DMEM (pH=7.5), DMEM_5mM (pH=7.6) - sono analizzati mediante spettroscopia UV-VIS. Per ognuno dei cinque campioni è stato fatto anche il campione usato come riferimento e posto nel secondo porta cuvette dello spettrofotometro. Si tratta di campioni contenenti buffer di spettroscopia K0, 0.5 ml di ognuna delle cinque soluzioni DMSO in volume pari al volume dell'emina e TE in volume pari al volume del DNA.

In relazione al campione K:D-rib_5mM è stato preparato anche un campione, denominato Emina contenente: 1,5 μM DNA; buffer di spettroscopia K0; 0,5 ml di soluzione K:D-rib 5mM; emina alla concentrazione finale 0.5 μM ;

3.5 ESPERIMENTI CD

Il dicroismo circolare è una tecnica simile alla spettrofotometria in quanto è basata sull'assorbimento da parte del campione di una radiazione UV o visibile. La differenza è che la radiazione usata in questo caso è polarizzata circolarmente, e quella che viene misurata è la differenza tra le assorbanze riscontrate usando come radiazioni incidenti radiazioni polarizzate circolarmente nei due possibili versi orario e antiorario. La luce polarizzata linearmente, invece, è una radiazione elettromagnetica in cui il vettore **E** oscilla in un solo ben preciso piano di polarizzazione. Se abbiamo due onde elettromagnetiche che si propagano in due piani ortogonali tra di loro e sfasate di 90° l'onda elettromagnetica che ne risulta è circolarmente polarizzata. In pratica il vettore campo elettrico **E** ruota con frequenza pari alla frequenza della radiazione: il risultato è che la punta del vettore percorre una traiettoria a spirale. L'onda si propaga quindi come una funzione che descrive una traiettoria a spirale e non più sinusoidale. Si possono costruire così due onde polarizzate circolarmente a destra e a sinistra. Se prendiamo quindi due onde che hanno la stessa intensità, frequenza e lunghezza d'onda ma sono rispettivamente circolarmente polarizzate destra e sinistra la luce che ne risulterà sarà linearmente polarizzata. Quindi una luce linearmente polarizzata la si può pensare come la somma di due onde polarizzate circolarmente una destrorsa e una sinistrosa.

Quando un raggio di luce passa attraverso la materia, il vettore campo elettrico (**E**) dell'onda che si propaga interagisce con gli elettroni degli atomi che compongono il materiale. Questa interazione ha sia l'effetto di ridurre la velocità di propagazione sia di diminuire l'ampiezza del vettore **E**. La riduzione della velocità di propagazione è chiamata rifrazione ed è descritta dall'indice di rifrazione, n , e la diminuzione dell'ampiezza di **E** è chiamata assorbimento e dipende dal coefficiente di estinzione molare ϵ . Entrambi questi parametri dipendono dalla lunghezza d'onda in modo tale da riflettere la struttura elettronica e la geometria delle molecole. Esistono molecole che sono sensibili al piano di polarizzazione della luce incidente. Queste molecole o cromofori si dicono otticamente attivi e si distinguono per avere diversi indici di rifrazione n_R o n_L e diversi coefficienti di estinzione molare ϵ_R o ϵ_L per la luce polarizzata destrorsa o sinistrosa. La proprietà che caratterizza se un cromoforo è otticamente attivo è l'asimmetria. Se gli indici di rifrazione sono diversi la componente destra R e sinistra L sono ognuna ritardata in modo diverso e all'uscita dal mezzo la fase tra le due componenti sarà diversa, per cui in ogni punto dello spazio il vettore **E** della componente destra R e sinistra L sarà polarizzato in un piano il cui angolo sarà diverso da piano di polarizzazione del vettore **E** dell'onda incidente. Oltre al ritardo anche l'intensità può cambiare in un mezzo otticamente attivo, per cui si ha un differente assorbimento espresso in termini di coefficienti di assorbimento per la luce polarizzata destrorsa o sinistrosa.

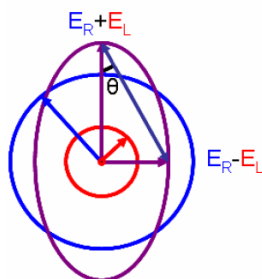
La quantità di interesse è la differenza tra i coefficienti di estinzione molare $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ (cm⁻¹ M⁻¹) chiamata dicroismo circolare, che è legata alla differenza tra le assorbanze in quanto

$$A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d$$

Sperimentalmente si misura l'ellitticità θ . Si definisce ellitticità θ l'arcotangente del rapporto tra l'asse maggiore e l'asse minore dell'ellisse descritta dal vettore polarizzazione della luce uscente dal mezzo.

$$\text{tg} \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}$$

$$\theta = \ln(10)(A_L - A_R) \frac{180}{4\pi}$$



Nell'esperimento presentato gli spettri saranno rappresentati in unità arbitrarie (u.a), poiché non si intende avere una quantificazione delle specie in oggetto ma solo monitorare il cambiamento conformazionale.

Il CD permette di trarre importanti informazioni su molecole chirali. Può essere usato per determinare la configurazione assoluta di una molecola, ma anche configurazioni relative e le

diverse conformazioni . Le misure sono state fatte con una cella di 2 mm di cammino ottico alla temperatura di 22°C. Le misure sono state raccolte nel range 220nm - 340nm, con un intervallo di 0.5 nm. Lo spettro CD è stato raccolto mediando tre acquisizioni.

3.5.1 Folding di strutture G-quadruplex.

Il protocollo seguito è quello proposto da Sattanathan Paramasivan et al. La sequenza utilizzata è il PS2.M 5'-GPGGGTAGGGCGGGTTGG-3' (Tema Ricerca) ricca in guanine che similmente a quanto fatto per la sequenza PS5.M è ricostituita in tampone TE e conservata a -20°C alle concentrazioni di 500 µM e 250 µM . Le concentrazioni si sono verificate, tramite spettroscopia UV-VIS misurando l'assorbanza di picco a 252,8 nm. A questa lunghezza d'onda il coefficiente d'estinzione molare ϵ è di 190097,6 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Anche quest'oligonucleotide sintetico folda in strutture G-quadruplex.

PS2.M è stato scongelato partendo dalla soluzione stock e ne è stata verificata nuovamente la concentrazione. Lo stock è stato riscaldato a 95°C per 5 minuti e lasciato raffreddare a temperatura ambiente. Il DNA è stato diluito quindi ad una concentrazione finale di 10 µM in EDTA 0.1mM a pH=7.0 a cui sono stati aggiunti diversi quantitativi di soluzione di KCl 1M , per raggiungere le desiderate concentrazioni di 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM e 10 mM di KCl e per permettere il folding del G-quadruplex.

3.6 AFM - ParkXE100

Il microscopio a forza atomica si basa sull'interazione fra gli atomi della punta ed il campione che si vuole analizzare. Due tipologie di forze entrano in gioco nel funzionamento dell'AFM quando gli atomi della punta interagiscono con gli atomi del campione: forza attrattiva (F_{el}) e una forza repulsiva (F_{ion}). F_{el} è una forza attrattiva che si sviluppa tra il nucleo di un atomo e gli elettroni di valenza dell'altro, mentre la F_{ion} è una forza elettrostatica repulsiva e s'instaura tra due nuclei dei due atomi in questione (Manuale Park).

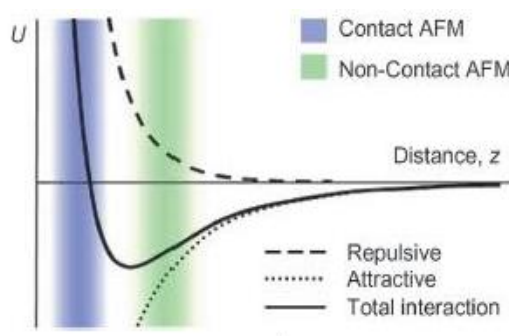


Figura3.2: Rappresentazione forze interatomiche in relazione alla distanza tra punta e campione

Esiste una distanza fra gli atomi costituenti la parte finale della punta ed il campione per cui le forze repulsive diventano dominanti è in questo *range* di forze che lavora il microscopio di forza atomica in modalità *contact*. Quando la distanza fra punta e campione aumenta le forze attrattive tra gli elettroni di valenza ed i nuclei diventano significative. In questo caso l'AFM è utilizzato in modalità *non contact* (figura3.2).

La modalità d'acquisizione *non contact* preserva l'integrità del campione rispetto alla modalità *contact*, in particolare nel caso dei campioni biologici. Il cuore del microscopio a forza atomica è la punta (talvolta chiamata anche sonda) la quale è posizionata all'estremità flessibile di un cantilever. La punta ed ha un diametro tra 1 nm e 50 nm. Il campione da analizzare è montato su un porta campione a sua volta posizionato su un piezo in grado di muoversi in direzione x-y garantendo così la scansione del campione linea per linea, lungo l'asse x-y. Durante la scansione la modificazione delle forze tra gli atomi del campione e quelli della punta possono essere rilevate monitorando di quanto il cantilever deflette attraverso un sistema ottico. Il raggio laser dal cantilever viene inviato, attraverso un sistema di specchi opportunamente posizionati e regolati, ad un fotodiodo chiamato *Position Sensitive Photo Detector* (PSPD). Questo monitora l'intensità e la posizione del laser durante tutta la scansione rilevando se vi sono modificazioni della frequenza di oscillazione e della posizione della punta durante la scansione, rispetto al settaggio iniziale. In questo modo, il segnale inviato al PSPD viene utilizzato per garantire il controllo dello scanner sia lungo l'asse z che lungo l'asse x-y (Manuale Park). Questo tipo di controllo lungo l'asse z (feedback loop) è possibile perché l'AFM ParkXE100 ha disaccoppiato il movimento lungo l'asse x-y con quello lungo l'asse z. Le misure sono state condotte utilizzando il microscopio a forza atomica Park XE-100. Tramite il software XEP si controllano i parametri del microscopio necessari per le misure e tramite il software XEI che controlla la fotocamera, si visualizza il campione ed il cantilever.

Le misure sono state condotte in aria ed in modalità *non contact*, utilizzando punte PPP-NCHR con le seguenti caratteristiche: drive 9.9 %, Frequenza 310 Hz e Force constant 42 N/m.

Hs 578T e Hs 578Bst necessitano di parametri di misura diversi. Regioni con altezze diverse richiedono un valore di z servo più alto, una velocità di scansione più bassa ed il set point, mentre regioni con altezze regolari, possono essere misurate con un valore di z servo più basso ma permettono un valore di set point più alto ed una velocità di scansione più alta.

Per questo motivo le immagini sono state acquisite, 256 pixel x 256 pixel, mediante scansione adattativa con i seguenti parametri:

Scan rate maximum 40 Hz;

Scan rate minimum 0,05 Hz

Step 0.02 Hz.

Error step: 5 mV

Threshold di 45 mV.

Solitamente si utilizza un range di *Set point* di 0.800 – 0.600 mentre lo *z Servo gain* tra 3.5 e 4.5. Entrambi i valori risentono della struttura del campione, della topografia e della tipologia del campione.

3.6.1 Preparazione campione Hs 578T

La linea cellulare Hs 578T, seminata alla concentrazione di 10000 cell/ml, è stata fatta crescere su un vetrino copri oggetto (Menzel Glaser) di dimensioni di 22 mm x 22 mm, posizionato all'interno di una Petri da 35mm (Sarsted). Il vetrino è stato fatto aderire 10' della semina delle cellule, lavando con PBS (lonza) 1X il fondo della petri, aspirando il liquido, posizionandovi il vetrino e facendo una leggera pressione per favorire l'adesione.

La linea cellulare è stata trattata per una settimana con K:D-rib 5mM cambiando il mezzo ogni 48h, mantenendo così il trattamento per tutta la durata dell'esperimento. Al termine le cellule sono state fissate con PFA 4% (Bio-optica), colorate con Giemsa (Fluka) ed analizzate all'AFM – ParkXE100. Tutte le soluzioni utilizzate per la fissazione e la colorazione sono state filtrate con filtro da 0.22µm, in modo da eliminare il più possibile le impurità che potrebbero disturbare la misura del campione.

3.6.2 Analisi delle immagini su Hs 578T

Le aree scansionate della linea cellulare tumorale Hs 578T sono diverse. Si sono misurate le regioni di connessione fra cellula ed il substrato di crescita (vetrino copri oggetto) e le regioni della membrana plasmatica sotto alla quale si trova il nucleo, il reticolo endoplasmatico rugoso e l'apparato di Golgi. Tutte le immagini acquisite sono state controllate ed analizzate con il programma XEI sviluppato dalla Park. Questo programma permette di correggere le immagini laddove presentino errori dovuti alla misura, come ad esempio errori dovuti all'isteresi del piezo impiegato per la scansione del campione lungo gli assi xy. Questi si riflettono nell'attribuzione di altezze non corrette alle strutture misurate. Le immagini sono state corrette con il flattening o appiattimento. Il flattening dell'immagine è stato eseguito con il programma XEI e verificato con il plugin *lineprofile*. Una delle opzioni è l'attribuzione delle altezze alle strutture misurate durante la scansione xy.. Utilizzando il line profile si riesce a visualizzare la topografia della linea scelta e si acquisiscono informazioni concernenti le altezze ed alle strutture in questione.

3.6.3 Preparazione campione Hs 578Bst - Trattamento e Irraggiamento

La linea cellulare Hs 578Bst è stata fatta crescere su un vetrino copri oggetto (Menzel Glaser) di dimensioni di 22 mm x 22 mm, posizionato all'interno di una Petri da 35mm (Sarsted). Il vetrino è stato fatto aderire 10' della semina delle cellule. L'adesione è avvenuta lavando il fondo della petri con PBS 1X (lonza), aspirando successivamente il liquido, posizionandovi poi il vetrino e facendo una leggera pressione per favorire l'adesione.

Le cellule sono state pretrattate con il K:D-rib 5mM per 24h prima del primo irraggiamento. Le cellule sono state irraggiate per due volte a distanza di 24h ciascuna. La dose somministrata è stata pari a 1.01Gy/min e l'irraggiamento è avvenuto con un tubo a raggi X (Faxitron cabinet 43855D) con finestra di Be ad anodo fisso su un piatto rotante per garantire l'uniformità di dose. Le cellule sono state irraggiate per 2 min (110 KV e 2mA). Dopo circa 9 h dal primo irraggiamento il mezzo è stato cambiato somministrando nuovamente K:D-rib 5mM. Il giorno successivo alla stessa ora le cellule sono state nuovamente irraggiate con le stesse modalità. Dopo due ore dal secondo irraggiamento le cellule sono state fissate con PFA 4% (Bio-optica), colorate con Giemsa (Fluka) ed analizzate all'AFM – ParkXE100. Tutte le soluzioni utilizzate per la fissazione e la colorazione sono state filtrate con filtro da 0.22µm, in modo da eliminare il più possibile le impurità che potrebbero disturbare la misura del campione.

3.6.4 Analisi delle immagini AFM Hs 578bst

Le aree scansionate della linea cellulare non tumorale Hs 578Bst sono diverse. Si sono misurate le regioni di connessione fra cellula ed il substrato di crescita (vetrino copri oggetto), le regioni della membrana plasmatica in cui il citoscheletro sottostante spinge contro la membrana. Altre regioni d'interesse sono le porzioni in cui la cellula mostra la membrana plasmatica riarrangiata ed un in "tensione", dovuta alla posizione in cui si trova la cellula.

Tutte le immagini acquisite sono state analizzate con il programma XEI sviluppato dalla Park. Questo programma permette di correggere le immagini laddove presentino errori dovuti alla misura, come ad esempio errori dovuti all'isteresi del piezo impiegato per la scansione del campione lungo gli assi xy. Questi si riflettono nell'attribuzione di altezze non corrette alle strutture misurate. Le immagini, ove possibile, sono state corrette con il *flattening* o appiattimento. Il *flattening* dell'immagine è stato eseguito con il programma XEI e verificato con il plugin *lineprofile*. Inoltre il line profile ci permette di misurare le dimensioni delle regioni danneggiate dall'irraggiamento, dandoci così un'idea anche della profondità della regione danneggiata.

4 RISULTATI

4.1 CAMPIONI UV-VIS

La soluzione acquosa K:D-rib ed i suoi componenti, D-ribosio e KHCO_3 , sono stati studiati tramite spettroscopia UV-VIS a temperatura ambiente sia dopo 4h in incubatore a 37°C , in atmosfera umidificata con CO_2 al 5%, come descritto in materiali e metodi. Gli spettri sono stati acquisiti nella regione UV-VIS, da 200 nm fino a 550 nm e sono riportati in figura 4.1.

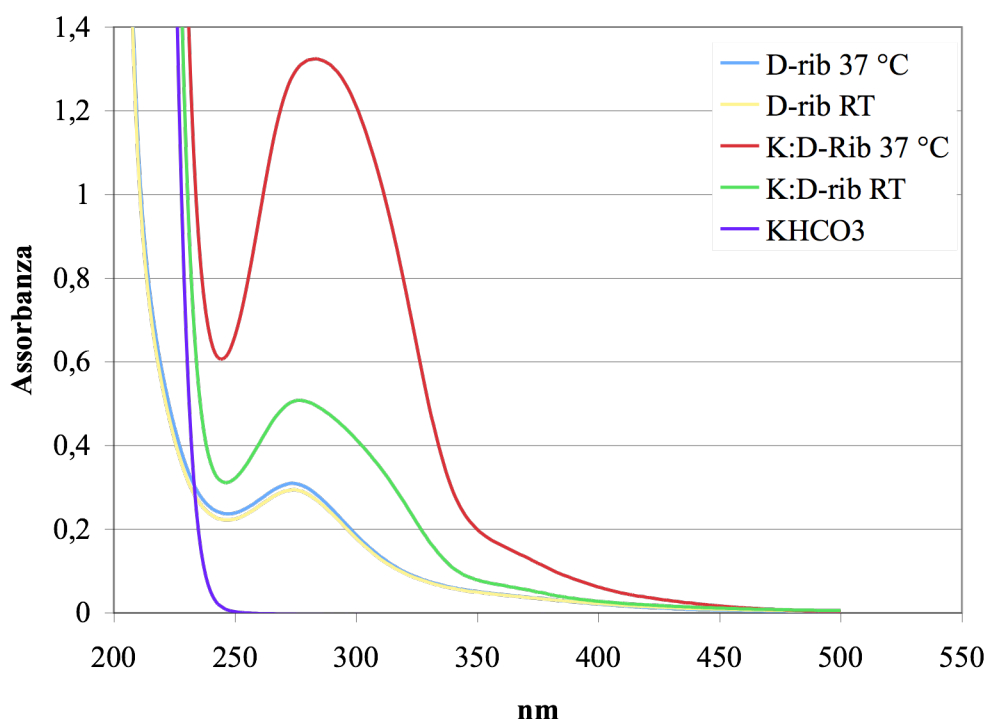


Figura 4.1: Spettri d'assorbimento UV-VIS: K:d-rib 37°C (rosso), K:D-rib a temperatura ambiente (verde), D-ribosio 37°C (azzurro), D-ribosio a temperatura ambiente (giallo), KHCO_3 (viola)

Lo spettro del KHCO_3 , rappresentato dalla linea viola, mostra assorbimento solo nella regione UV attribuibile alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ del gruppo carbossilico e non mostra cambiamenti a 37°C rispetto alla temperatura ambiente (RT). Per questo motivo è stato riportato solo lo spettro di assorbimento a 37°C . Lo spettro d'assorbimento del D-ribosio RT, riportato in giallo, può essere fittato con due componenti, caratteristiche delle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ che per un composto carbonilico non coniugato cade nel lontano UV e $n \rightarrow \pi^*$ che per la maggiore energia degli elettroni negli orbitali di tipo n cade nel vicino UV, nel nostro caso a 278 nm. Questa transizione (chiamata banda R) è molto debole di solito con ϵ minore di 30. Il D-ribosio mostra lo stesso spettro di assorbimento a temperatura ambiente e a 37°C .

Lo spettro del K:D-rib RT è riportato in verde. L'assorbimento nella regione lontano UV è caratterizzato dalle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ del gruppo carbossilico e del gruppo carbonilico, dal fit posso essere attribuiti due picchi uno a 274 nm e l'altro a 303 nm, caratteristici di transizioni $n \rightarrow \pi^*$. Lo spettro del K:D-rib a 37 °C è riportato in rosso è formato dalle stesse componenti dello spettro a RT ma in quantità maggiori. Sebbene le componenti non siano facilmente quantificabili, non conoscendo coefficienti di assorbimento ϵ , ne potendo fare il fit nelle regioni lontano UV, si può comunque stimare che queste componenti abbiano una concentrazione più del doppio rispetto alle stesse a RT.

4.2 INTERAZIONE FRA BROMURO DI TETRAZOLIO e K:D-rib

Gli spettri di assorbimento UV-VIS che evidenziano l'interazione fra il K:D-rib ed il bromuro di tetrazolio sono riportati in figura 4.3 (A). Gli spettri sono stati acquisiti da 350 nm fino a 700 nm. I campioni incubati con il sale sono stati preparati, in accordo con materiali e metodi, impiegando diverse concentrazioni di K:D-rib: 150 mM, 75 mM, 15 mM, 10 mM, 5 mM e 1,5 mM. Lo spettro con K:D-rib 150 mM ha mostrato particelle di formazan in sospensione nonostante fosse stato incubato con SDS e per questo motivo non è stato acquisito. Dall'analisi degli spettri si è sottratto lo spettro del K:D-rib. Questo ha permesso di ottenere solo lo spettro del *formazan* presente nel campione. In questo modo si sono effettivamente ottenuti gli spettri dell'interazione bromuro di tetrazolio - K:D-rib. Lo spettro di assorbimento del formazan ottenuto da K:D-rib 75 mM è riportato in figura 4.3 (A) in alto a destra, avendo un assorbanza molto più alta rispetto agli altri campioni. In figura 4.3 (B) è riportato lo spettro UV/VIS di una soluzione di bromuro di tetrazolio con SDS (linea tratteggiata nera) e lo spettro del formazan fornito nel *data sheet* del prodotto dell'azienda *ROCHE* (linea tratteggiata rossa).

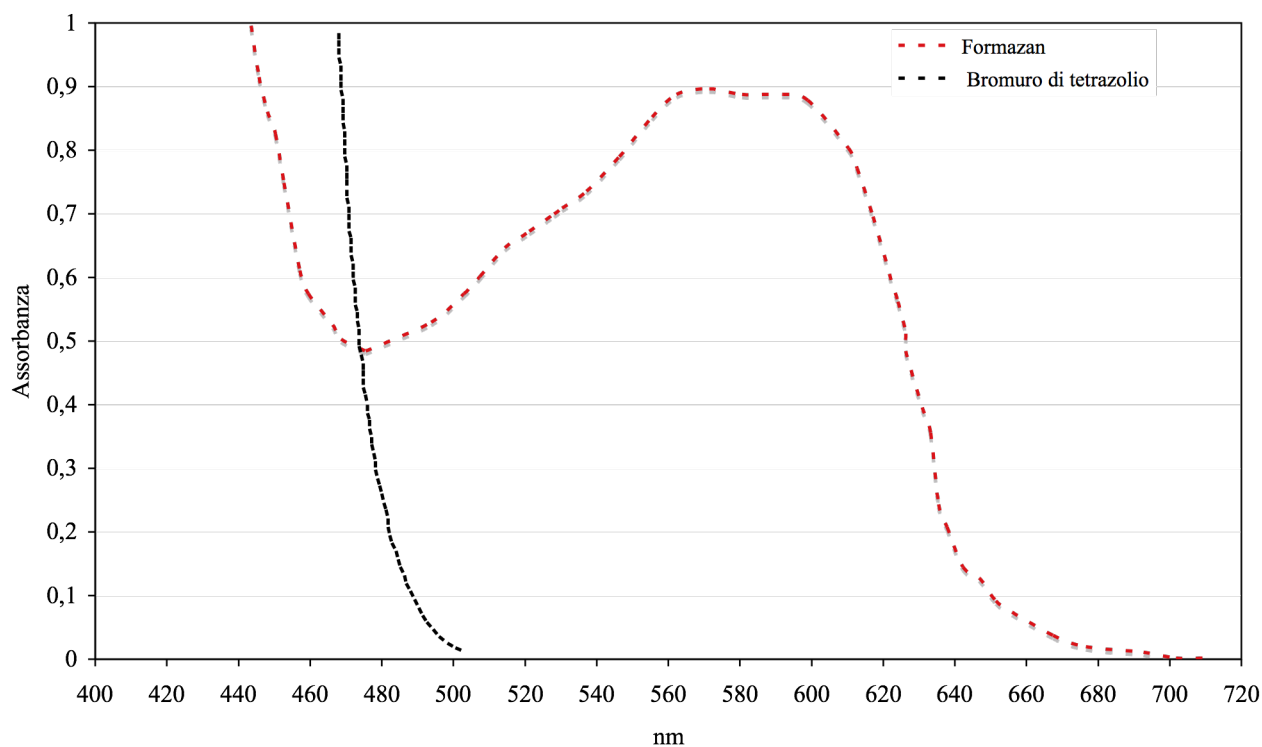
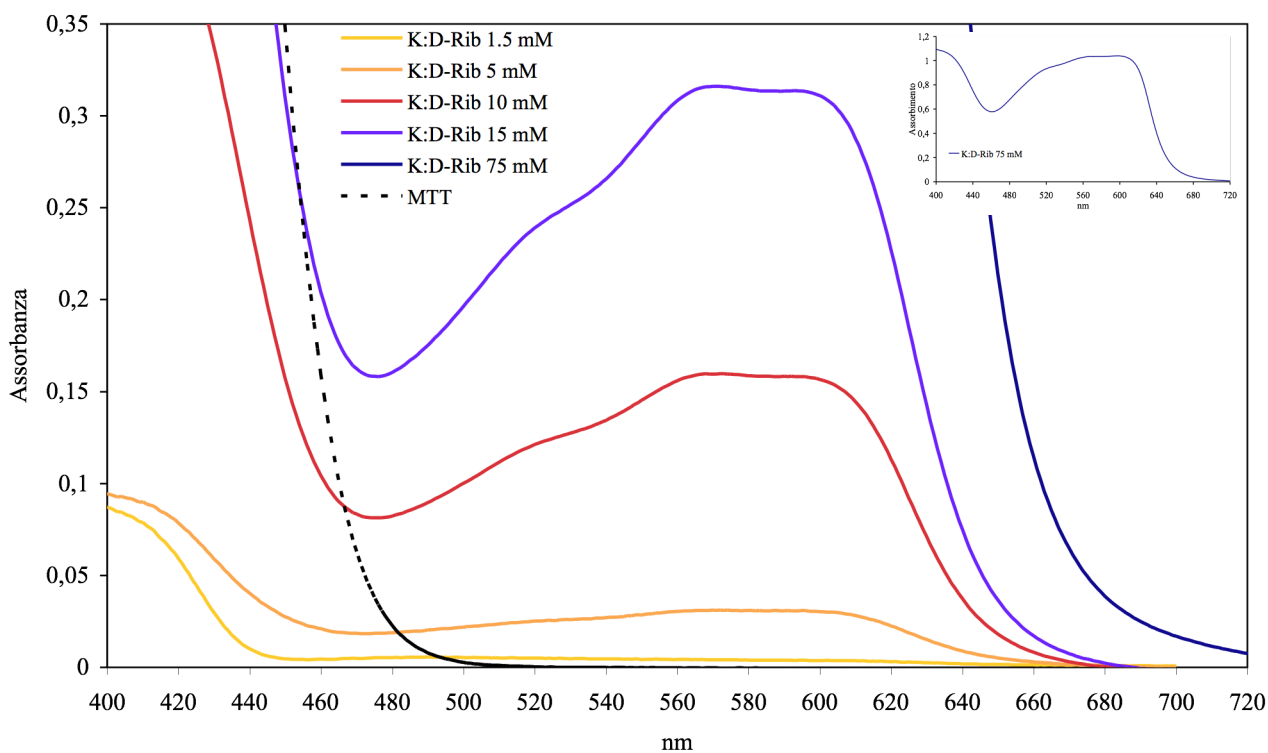


Figura 4.2 A) Spettri di assorbimento UV-VIS del *formazan* ottenuto da K:D-rib e bromuro di tetrazolio a diverse concentrazioni dopo solubilizzazione con SDS: 15 mM, 10 mM, 5 mM ed 1.5 mM (linee colorate). Nel riquadro più piccolo è rappresentato lo spettro con 75 mM di K:D-rib dopo solubilizzazione con SDS. La linea nera tratteggiata rappresenta lo spettro di assorbimento UV-VIS del solo bromuro di tetrazolio con SDS. B) Spettri d'assorbimento UV-VIS del *formazan* (linea tratteggiata viola) e del bromuro di tetrazolio (Roche), linea tratteggiata nera, presenti sul datasheet (Roche).

4.3 PROLIFERAZIONE Hs 578T

Per studiare gli effetti del trattamento con K:D-rib sulla proliferazione della linea Hs 578T (Croci et al 2011), si sono utilizzati metodi alternativi ai saggi convenzionali: **n° di split, curve di crescita e saggio delle colonie.**

4.3.1 Numero di split

La linea cellulare Hs 578T è stata trattata con K:D-rib 5mM e la proliferazione saggiata attraverso il numero di split, in accordo con materiali e metodi. La durata del trattamento è stata di 50 giorni come riportato in figura 4.3.

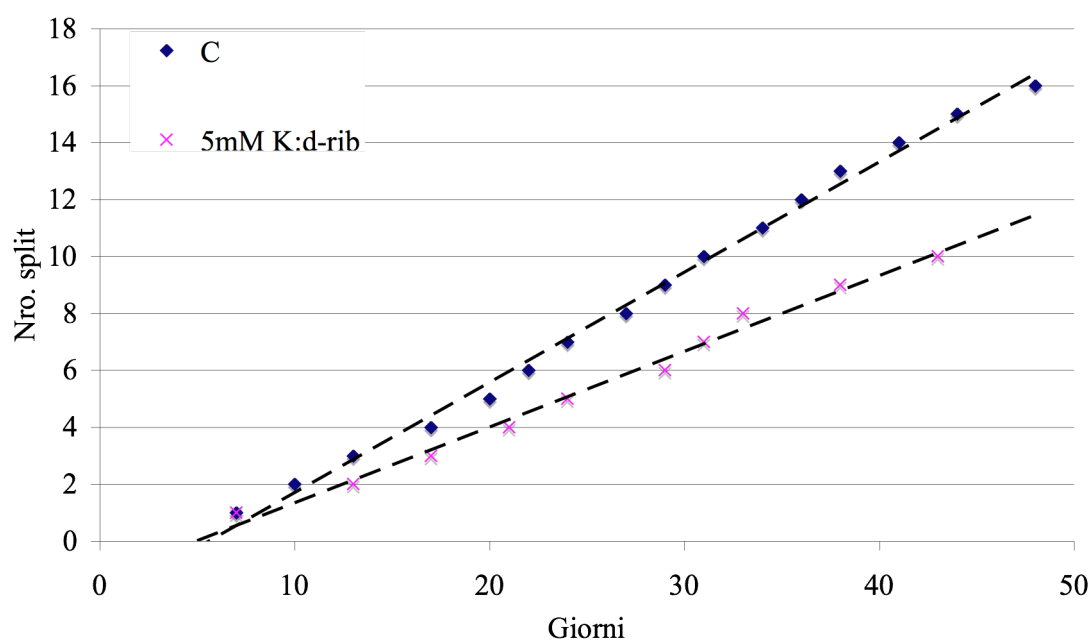


Figura 4.3: Sono riportati in grafico il n° di split del controllo (rombi blu) e del trattato (croci rosa) per la linea Hs 578T in funzione del trattamento con K:D-rib 5mM.

Le cellule di controllo e le trattate sono state splittate la prima volta al settimo giorno di coltura. Al decimo giorno di esperimento il controllo è stato splittato due volte, mentre il trattato è stato splittato solo una volta. Nell'arco dei 50 giorni di trattamento le cellule di controllo sono state splittate 16 volte, mentre il trattato è stato splittato 10 volte. Dal grafico si può notare che l'andamento dei punti del controllo è lineare ed è descritto dalla retta di regressione ($R^2 = 0.9953$) tratteggiata in figura 4.4. La curva di regressione lineare dei punti del trattato ha un valore $R^2 = 0.9896$ interpolando in modo peggiore l'andamento dei punti del trattato.

4.3.2 Calcolo del tempo di duplicazione Hs 578T

In seguito al numero di split si è deciso d'indagare circa gli effetti del trattamento con K:D-rib sulla proliferazione della linea Hs 578T, mantenendo la linea cellulare in coltura per tempi più brevi. Per il calcolo del tempo di duplicazione (DP) si sono utilizzati due metodi differenti. Uno prevede che tutte le cellule presenti nel pozzetto fossero fotografate e contate. Nell'altro caso, solo alcuni campi scelti in modo opportuno. Dapprima si è indagato che entrambi i metodi fossero consistenti.

METODO 1 La linea cellulare Hs 578T è stata seminata alla concentrazione di 20000 cell/ml in piastra multi pozzetto, in accordo con materiali e metodi. Si è poi lasciata in coltura per 96h ed ogni 24h i pozzetti di crescita sono stati fotografati, conoscendo così il numero effettivo di cellule presenti nel pozzetto nell'arco delle 96h di coltura.

METODO 2 La linea cellulare Hs 578T è stata seminata alla concentrazione di 4000cell/ml e mantenuta in trattamento per 12 giorni, in accordo con materiali e metodi. Le cellule presenti nei campi scelti su assi perpendicolari e passanti per il centro della Petri (si veda Materiali e Metodi) sono state fotografate ed in seguito contate.

Per entrambi i metodi, la proliferazione cellulare è stata quantificata utilizzando il DP (tempo di duplicazione). È ormai noto che le cellule tumorali crescono *in vitro* seguendo un andamento esponenziale. Il numero di cellule è stato rappresentato dalla seguente equazione:

$$\ln_2(N) = \frac{t}{d} + \ln_2(N_0)$$

dove N è il numero di cellule al tempo t , N_0 è il numero di cellule iniziale e d è il tempo di duplicazione (DP). Nella figura 4.4 sono riportate le rette di regressione calcolate dai dati relativi al metodo 1 ed al metodo 2.

Come riportato in Figura 4.4, le due rette rappresentano l'andamento della proliferazione cellulare il metodo 1 (punti rossi) ed il metodo 2 (punti blu), hanno la stessa pendenza. In particolare, per il metodo 1 $N_0 = 11036 \pm 153$ cellule e $d = 40 \pm 5$ h. Per questo metodo, applicando la formula del DP, abbiamo ottenuto un valore iniziale di cellule (N_0) in accordo con il numero di cellule seminate (~10000). Per il metodo 2 abbiamo calcolato un tempo di duplicazione $d = 44 \pm 1$ h che è in accordo con il metodo 1. Gli effetti del trattamento con K:D-rib si sono calcolati utilizzando il metodo 2.

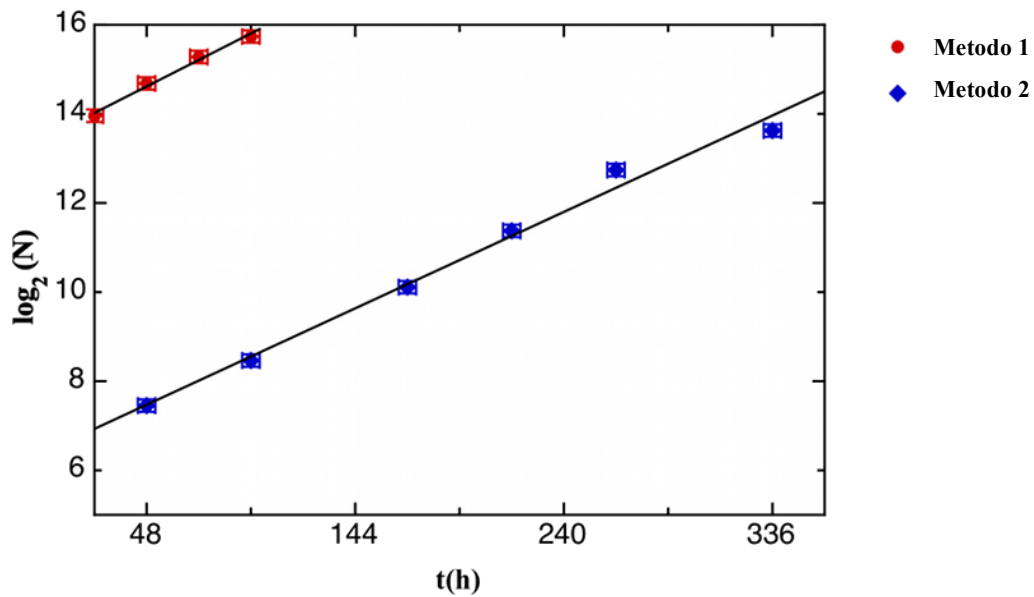


Figura 4.4: Il numero di cellule (N) graficato in funzione del tempo d'incubazione, per il metodo 1 (punti rossi) e per il metodo 2 (punti blu). Le rette di regressione lineare, hanno la stessa pendenza.

La linea cellulare Hs 578T è stata seminata in accordo con il metodo 2 e trattata con una soluzione K:D-rib 5mM. La regressione lineare del trattato T ha una pendenza che è differente rispetto al controllo C. Dall'analisi dei dati ottenuti, i risultati in termini di DP sono: DP controllo (C) = $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ mentre DP trattato (T) = $59 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$; figura 4.5.

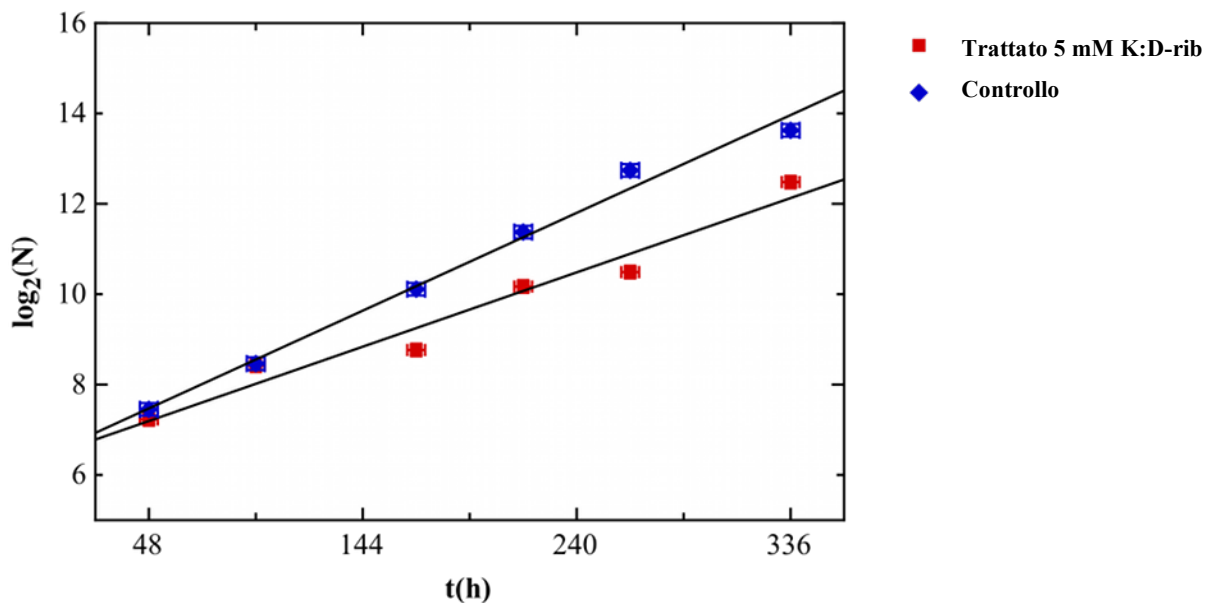


Figura 4.5: Numero di cellule (N) in funzione del tempo di incubazione. Le cellule di controllo, rappresentate dalla retta con i punti blu e le cellule trattate con 5mM K:D-rib sono rappresentate con i punti rossi. La pendenza è inversamente proporzionale ai tempi di duplicazione: d trattato = $59 \pm 2 \text{ h}$ e d controllo = $44 \pm 1 \text{ h}$

Il t-test dei dati ottenuti restituisce un valore $t = 3.114 > t_c = 2,571$ ($P = 0.05$) indicandoci la robustezza del dato.

4.3.3 Saggio delle colonie

Un altro aspetto dello studio della proliferazione è indagato con il saggio delle colonie, condotto in accordo con il protocollo descritto in materiali e metodi. I risultati sono riportati in figura 4.6.

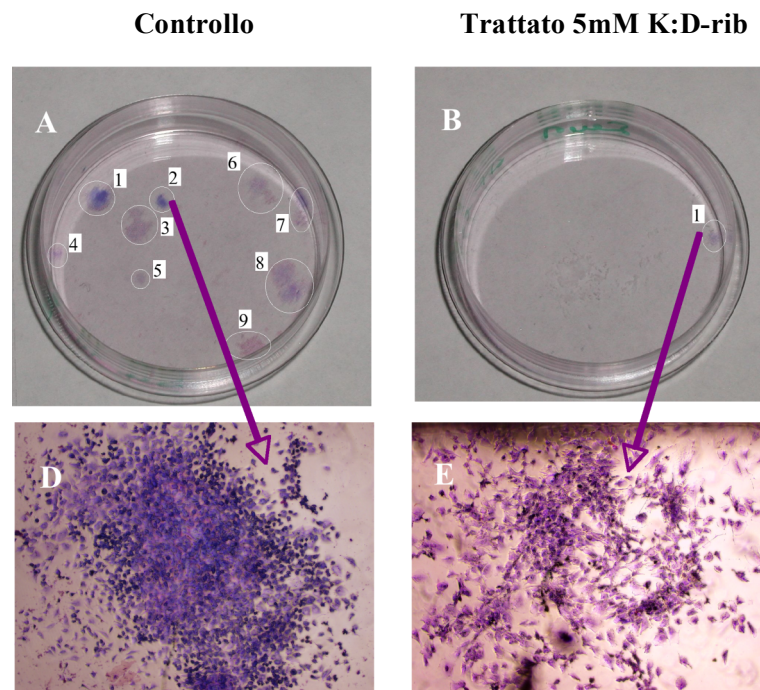


Figura 4.6: Saggio delle colonie su linea cellulare di carcinoma mammario umano (Hs 578T) trattato con K:D-rib 5mM. Foto della

A) Petri in cui sono state seminate le cellule di controllo. Sono contabili 9 colonie.

B) Foto della Petri in cui sono state trattate le cellule con 5mM di K:D-rib, contabile 1 colonia.

D) Foto della colonia n° 2 del controllo acquisita al microscopio ottico con ingrandimento 10X,.

E) Foto della sola colonia del trattato con 5mM K:D-rib acquisita al microscopio ottico con ingrandimento 10X,.

Si sono quindi contate le colonie; con colonia intendiamo un gruppo di cellule di almeno 50 unità. Com'è riportato dalla foto acquisita con fotocamera digitale in figura 4.6 A, la linea cellulare non trattata Hs 578T ha originato 9 colonie. In figura 4.5 D è riportata la colonia n° 2 del controllo fotografata al microscopio ottico utilizzando un ingrandimento 10X. Il saggio delle colonie sulla linea Hs 578T è stato fatto trattando le cellule con K:D-rib 5mM, 10 mM e 15 mM. Tuttavia il trattamento a 10 mM e 15 mM non ha originato colonie.

Per in trattamento con a 5mM K:D-rib, in figura 4.6 B è riportata la foto acquisita con fotocamera digitale, della sola colonia originata e in figura 4.6 E è riportata la foto acquisita al microscopio ottico, con un ingrandimento 10X, della colonia originata. Confrontando le foto 4.6 D e 4.6 E si nota che la colonia 2 è formata da un numero di cellule nettamente superiore rispetto al

numero di cellule che formano la colonia del trattato. Inoltre la dimensione delle cellule trattate è maggiore rispetto alla dimensione delle cellule di controllo.

4.3.4 Saggio di chemoinvasione

Il saggio di chemoinvasione è stato condotto in accordo con il protocollo di *Wiggins et al.*, (Ref).

Il numero di cellule in ogni spot (calcolato come spiegato in materiali e metodi - paragrafo 3.3.5) è stato normalizzato rispetto al controllo e riportato in figura 4.7, in funzione dei giorni di trattamento. Confrontando il dato relativo al controllo con il dato relativo ai cinque giorni di trattamento (tre giorni di pretrattamento più 2 giorni di saggio in cui il trattamento con K:D-rib 5mM è mantenuto) ed il dato relativo al settimo giorno (cinque giorni di trattamento più 2 giorni di saggio in cui il trattamento con K:D-rib 5mM viene mantenuto) è evidente una progressiva diminuzione del numero di cellule in grado di invadere lo spot d'agar. La maggior differenza si ha tra il settimo ed il nono giorno di trattamento. Al nono giorno il numero di cellule normalizzato è sceso a 0,2 registrando infatti una diminuzione dell'30% rispetto al settimo giorno. La colonna rossa nella figura 4.7 rappresenta il numero di cellule normalizzato dopo un pretrattamento di sette giorni con K:D-rib 5mM ma in questo caso il saggio d'invasione chemotattica è condotto senza trattamento. Il numero di cellule normalizzato è 0,55 ed è lo stesso di quello dopo cinque giorni di trattamento più due giorni di saggio di chemoinvasione, in cui il trattamento è mantenuto.

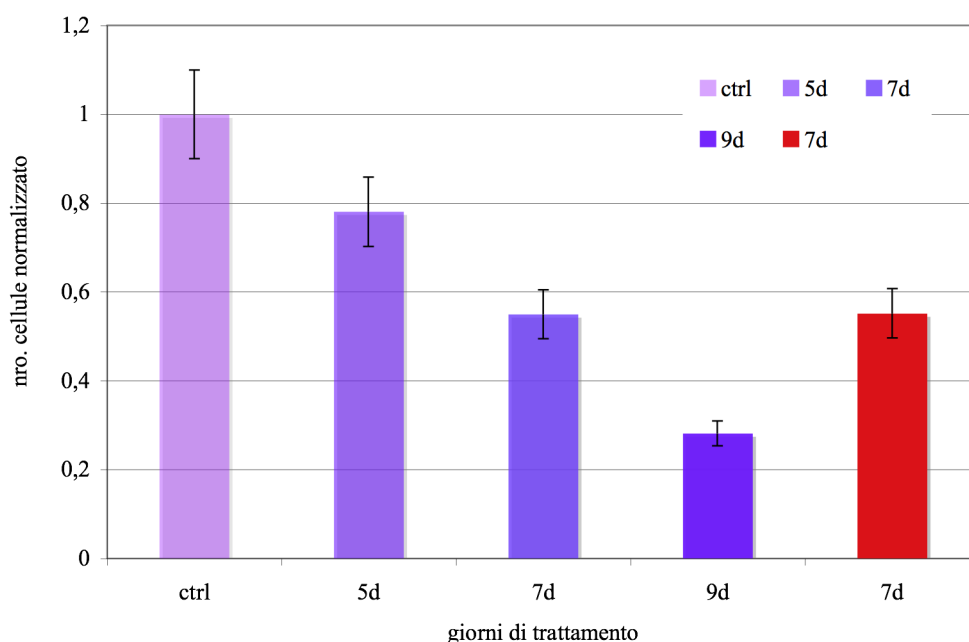


Figura 4.7: Risultati del saggio di chemoinvasione della linea cellulare Hs 578T. Il trattamento è avvenuto con K:D-rib 5mM. Il numero di cellule relativo è il numero di cellule che hanno raggiunto ed invaso lo spot d'agar con FBS. Ctrl = controllo.

5d → 3 giorni di pre trattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio.

7d → 5 giorni di pre trattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio.

7d – colonna rossa- → 7 giorni di pre trattamento con 2 giorni di saggio senza trattamento

9d → 7 giorni di pre trattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio.

Per ogni giorno di trattamento sono state acquisite, campo per campo, le foto di tutto lo spot di agar. Le foto qui riportate sono le più rappresentative tra le foto utilizzate per graficare i dati riportati nell'istogramma in figura 4.7.

In figura 4.8 sono riportate le foto più rappresentative del saggio di chemoinvasione per la linea cellulare Hs 578T. La linea bianca rappresenta la linea oltre o sopra la quale le cellule si considerano migrate; il conteggio è effettuato dal bordo verso l'interno. Le cellule sono migrate perché lo spot solidificato di agar ha come chemoattrattore FBS 10%. Sono distinguibili cellule a fuochi diversi, in quanto non tutte sono nello stesso piano dello spot in relazione alla sua convessità. In figura 4.8 A è riportata un'immagine del controllo in cui sono evidenti le cellule che hanno invaso lo spot d'agar e che si trovano oltre la linea bianca. Nell'immagine 4.8 B è mostrata la massima distanza radiale percorsa all'interno dello spot dalle cellule di controllo che è pari a 0.140 mm. In figura 4.8 C è riportata un'immagine del controllo negativo. Non essendovi FBS all'interno dello spot, le cellule non migrano al suo interno ovvero l'agar non è un chemoattrattore. La figura 4.8 D è relativa ai 5 giorni di trattamento con K:D-rib 5mM; tre giorni di pretrattamento e due giorni di saggio di chemoinvasione con trattamento. Com'è evidente nella foto di controllo le cellule sono in grado di invadere lo spot ma con minor forza rispetto al controllo. La figura 4.8 E rappresenta il potenziale cheminvasivo dopo 7 giorni di trattamento, cinque giorni di pretrattamento e due giorni di saggio di chemoinvasione con il trattamento attivo, ancora una volta le cellule riescono ad entrare nello spot in modo omogeneo. La figura 4.8 F rappresenta le cellule Hs 578T trattate per sette giorni interrompendo poi il trattamento durante il saggio. Le cellule migrano all'interno dello spot in numero simile alle cellule pretrattate per 5 giorni e trattate durante il saggio. La figura 4.8 G evidenzia l'effetto del trattamento di nove giorni con K:D-rib 5mM. Un numero significativamente inferiore di cellule migra ed invade lo spot d'agar. Inoltre rimangono per lo più vicino al bordo, tranne nell'immagine 4.8 H relativa alla massima distanza radiale percorsa che è pari a 0.11 mm.

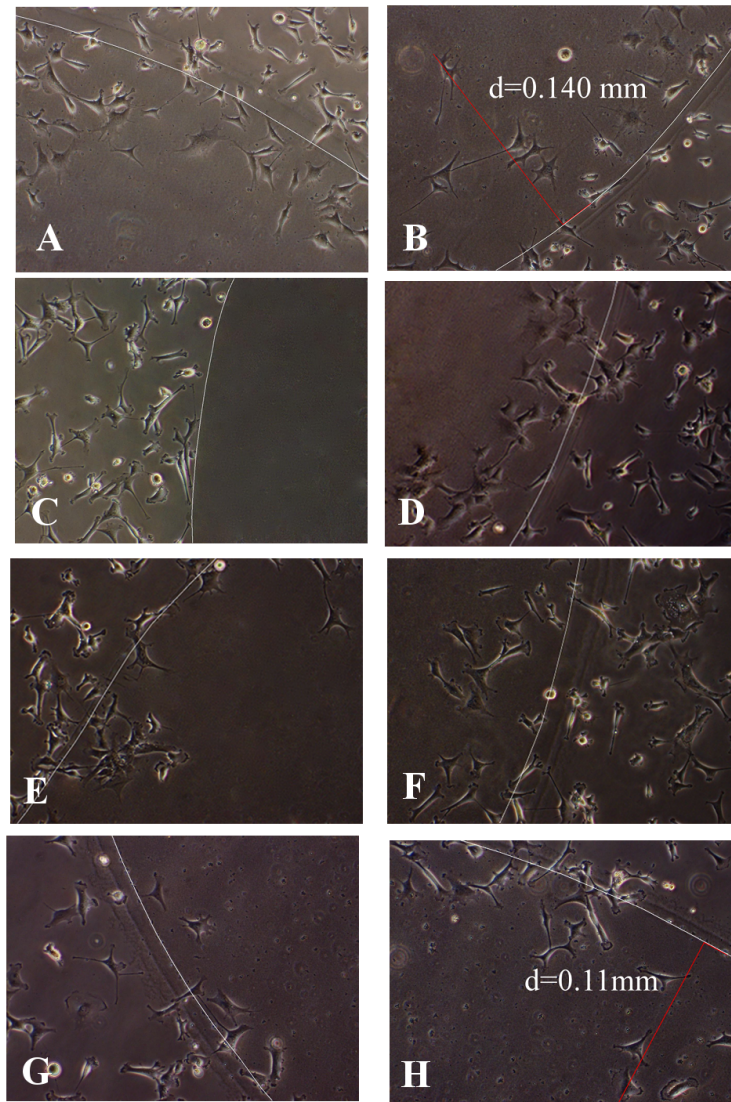


Figura 4.8: Sono riportate le immagini più rappresentative del saggio di chemonvazione.

- A) Controllo con FBS (Siero fetale bovino) all'interno dello spot d'agar.
- B) Controllo: massima distanza percorsa - 0.140 mm.
- C) Controllo Negativo: agar senza FBS all'interno.
- D) 3 giorni di pretrattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio
- E) 5 giorni di pretrattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio
- F) 7 giorni di pretrattamento con 2 giorni senza trattamento durante il saggio
- G) 7 giorni di pretrattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio
- H) 7 giorni di pretrattamento con 2 giorni di trattamento durante il saggio: massima distanza percorsa - 0.11 mm

4.4 PROLIFERAZIONE Hs 578Bst

La linea Hs 578Bst (epitelio mammario non tumorale umano) è stata trattata per 25 giorni con K:D-rib (soluzione acquosa di KHCO_3 e D-ribosio) alla concentrazione di 5 mM. L'andamento della proliferazione è riportato in figura 4.9.

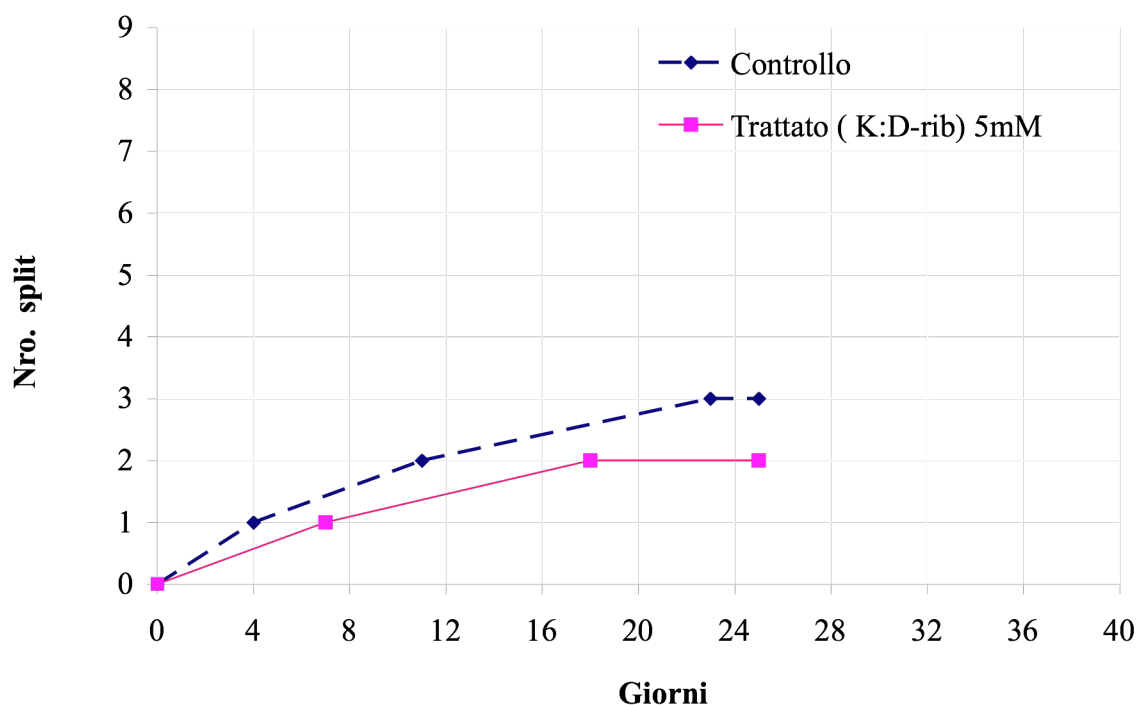


Figura 4.9: curve di proliferazione della linea Hs 578Bst a 25 giorni di trattamento con K:D-rib 5mM. N° di split in relazione ai giorni di trattamento. La curva nera tratteggiata rappresenta l'andamento del controllo, mentre la linea continua verde rappresenta l'andamento del trattato.

Le cellule di controllo sono state splittate tre volte durante l'esperimento, mentre le cellule trattate con il composto sono state splittate solo due volte. Nonostante questa differenza, possiamo notare che l'andamento del controllo e l'andamento del trattato sono sovrapponibili.

In accordo con questo dato sono le immagini in figura 4.10 acquisite al microscopio ottico, delle cellule Hs 578Bst di controllo e trattate.

La Figura 4.10 (a) mostra la morfologia delle cellule di controllo all'undicesimo giorno di coltura, mentre la Figura 4.10 (b) mostra la morfologia della linea cellulare trattata con K:D-rib 5mM al diciottesimo giorno. La morfologia cellulare delle cellule Hs 578Bst non trattate e trattate è comparabile e non sono evidenti cambiamenti rilevabili da un confronto d'immagini.

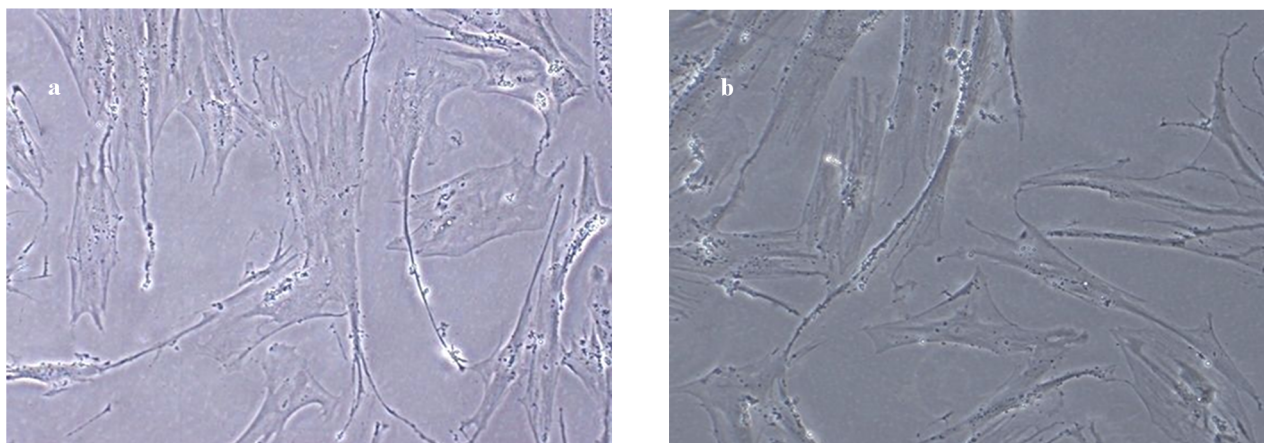


Figura 4.10: a cellule Hs 578Bst di controllo 11° giorno in coltura; b cellule Hs 578Bst di trattate con K:D-rib 5mM, 18° giorno in coltura.

Un altro esperimento di proliferazione cellulare è stato condotto per saggiare gli effetti di ogni componente del K:D-Rib, D-ribosio e KHCO_3 , come riportato in figura 4.11. La linea cellulare HTB-125 è stata trattata con 5 mM di D-ribosio, 5 mM di KHCO_3 e 5 mM di K:D-Rib. La durata dell'esperimento è stata di venticinque giorni. Dal grafico emerge che il numero di split della popolazione cellulare di controllo e quello delle cellule trattate è identico. Sono stati splittati due volte ciascuno. Il primo split è avvenuto nove giorni dopo la semina. Il secondo split per le cellule di controllo e per le cellule trattate con il solo KHCO_3 è avvenuto al sedicesimo giorno dopo la semina, ovvero dopo una settimana dal primo split. Mentre il secondo split per le cellule trattate con K:D-rib e D-ribosio è avvenuto dopo dieci giorni dal primo split, ovvero dopo diciannove giorni dalla semina.

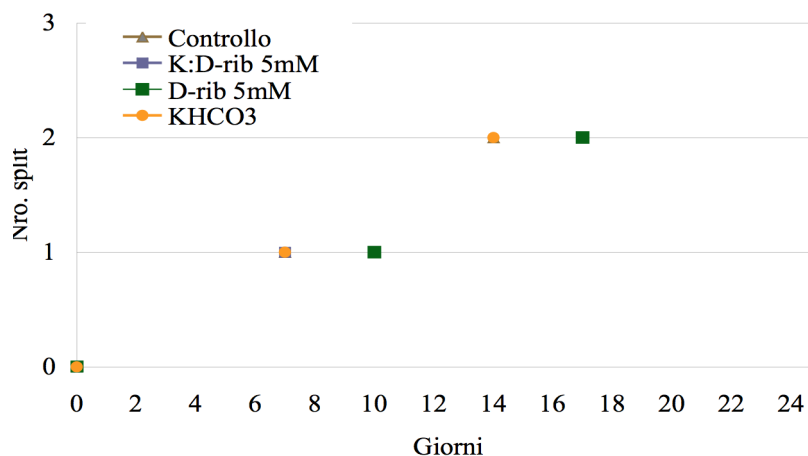


Figura 4.11 : Curve di proliferazione della linea Hs 578Bst a 25 giorni di trattamento con K:D-rib 5mM.(quadrati blu), D-ribosio 5mM (quadrati verdi) e KHCO_3 cerchietti gialli. È graficato il n° di split in funzione ai giorni di trattamento.

4.5 DNAzima COME BIOSENSORE DI IONI K^+

La formazione di DNAzima, è seguita e quantificata attraverso spettroscopia UV-VIS. Nella figura 4.12 sono riportati lo spettro dell'emina incubata con l'oligonucleotide PS5.M in buffer di spettroscopia in assenza di potassio (spettro rosso) e il DNAzima foldato (spettro azzurro) in presenza di K:D-rib 5mM in accordo con materiali e metodi.

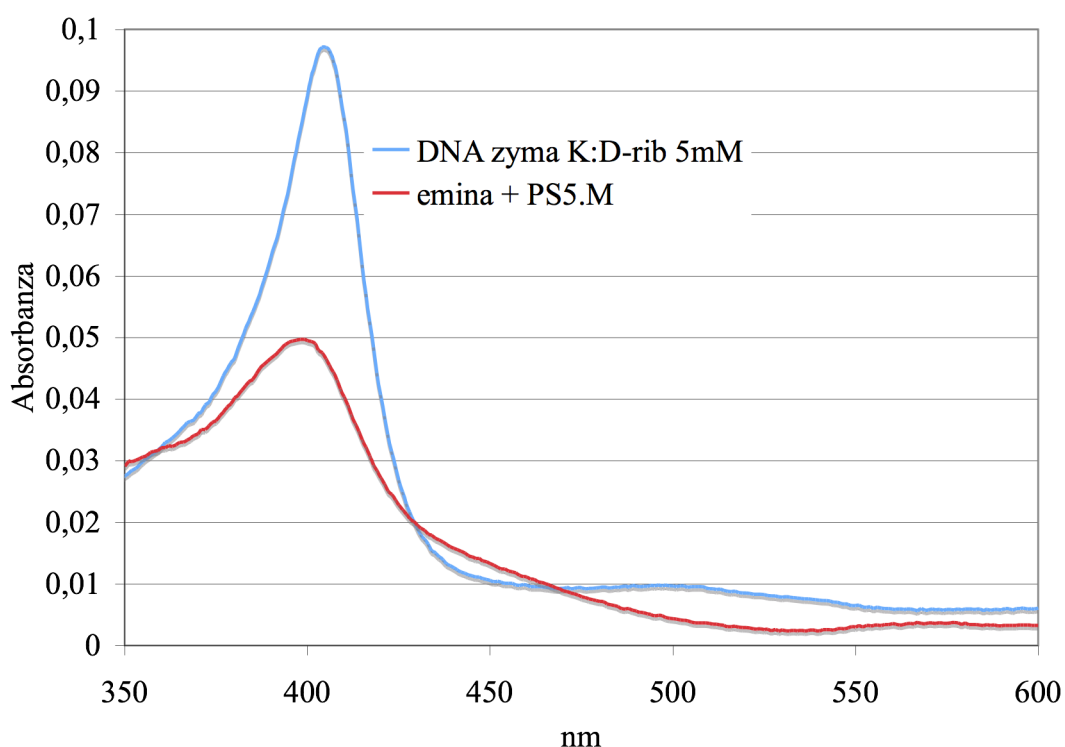


Figura 4.12: Spettri UV/VIS dell'emina incubata con l'oligonucleotide PS5.M in assenza di potassio (rosso) del DNAzima (azzurro) in presenza di K:D-rib 5mM.

Gli spettri qui riportati sono stati acquisiti nell'intervallo tra 350 nm e 600 nm. Lo spettro in rosso è caratteristico di quello della sola emina. In particolare a 399 nm ha un picco di assorbimento (banda Soret) dovuto alle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ relative agli orbitali dell'anello porfirinico. Lo spettro attribuibile al DNAzima {Travascio, 1998 #63} mostra una ipercromicità della banda di Soret, chiamata anche banda B, a 404 nm con un red shift rispetto lo spettro dell'emina. Inoltre presenta una banda a 502 nm e una spalla a 540 nm d'intensità molto inferiori, che nei complessi porfirinici sono chiamate banda Q_v (chiamata anche banda E) e banda Q_0 rispettivamente. La banda Q, come la Soret, è una banda di assorbimento di transizioni che riguardano solo gli orbitali dell'anello porfirinico, in particolare la banda Q_0 a frequenza minore corrisponde ad un livello dello stato Q non vibrazionale mentre la banda Q_v è considerata una struttura vibrazionale della prima.

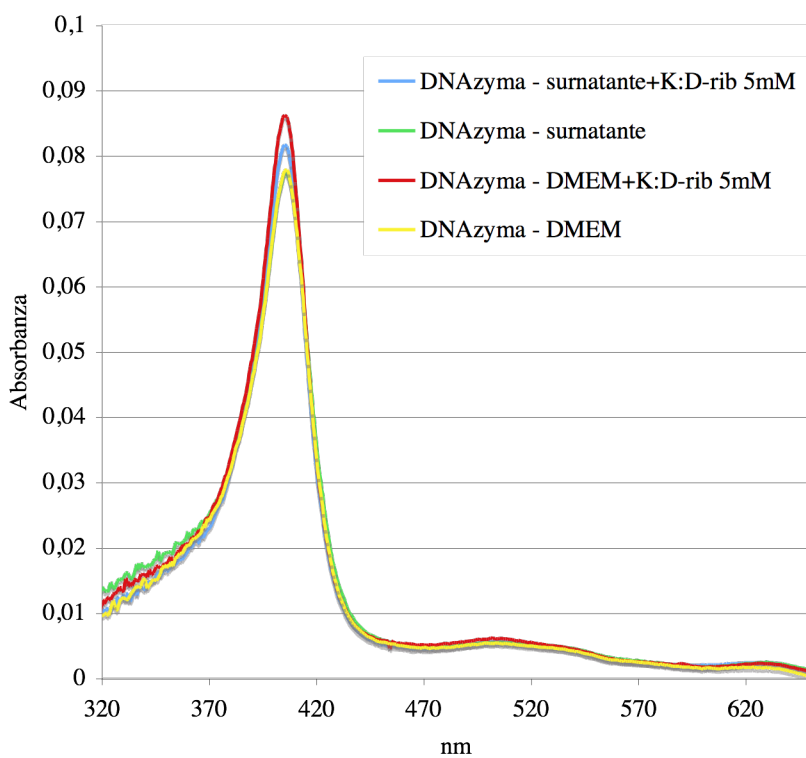


Figura 4.13 Spettri UV/VIS 300 nm – 700 nm del DNAzima. La molecola è stata foldata in presenza di ioni K^+ derivanti da: DMEM + K:D-rib 5mM (spettro rosso), DMEM (spettro giallo), surnatante Hs 578T trattato con K:D-rib 5mM (spettro azzurro) e surnatante delle cellule Hs 578T (spettro verde).

A seguito della formazione di DNAzima in presenza del K:D-rib 5mM si sono misurati, in un range tra 300 nm e 700 nm, gli spettri del DNAzima foldato in presenza di DMEM + K:D-rib 5mM (spettro rosso), DMEM (spettro giallo), surnatante Hs 578T trattato con K:D-rib 5mM (spettro azzurro) e surnatante delle cellule Hs 578T (spettro verde), vedi figura 4.13. Oltre alle bande precedentemente descritte, Soret e Q troviamo a lunghezze d'onda maggiore una altra banda a 629 nm, ben riconoscibile caratteristica delle macro-molecole contenenti l'eme (es metemoglobina), in cui il Ferro si trova in conformazione FeIII ad alto spin (HS). Tale banda, chiamata D, segna il trasferimento di carica tra l'orbitale 3d (xy o xz o yz) del Ferro e l'orbitale p (b_{2u}) dell'anello porfirinico. Gli spettri sono riportati in figura 4.14 sono stati "scalati" 10X per meglio visualizzare queste bande. Per quanto riguarda gli assorbimenti nella regione del visibile, a 502 nm e 629 nm relativi alle bande appena descritte, poiché i coefficienti di estinzione molare sono quasi 20 volte inferiori a quelli della banda di Soret, le differenze tra gli assorbimenti non sono significativi e rientrano nell'errore sperimentale. Come si può vedere dalla figura 4.13, tutti i quattro spettri mostrano andamenti uguali ma con intensità diverse. In particolare lo spettro più intenso, in rosso, è

quello relativo al campione DMEM + K:D-rib 5mM, a seguire abbiamo quello azzurro, relativo al surnatante Hs 578T trattato con K:D-rib 5mM, e infine ad uguale intensità lo spettro verde e giallo rispettivamente del surnatante delle cellule Hs 578T e del DMEM .

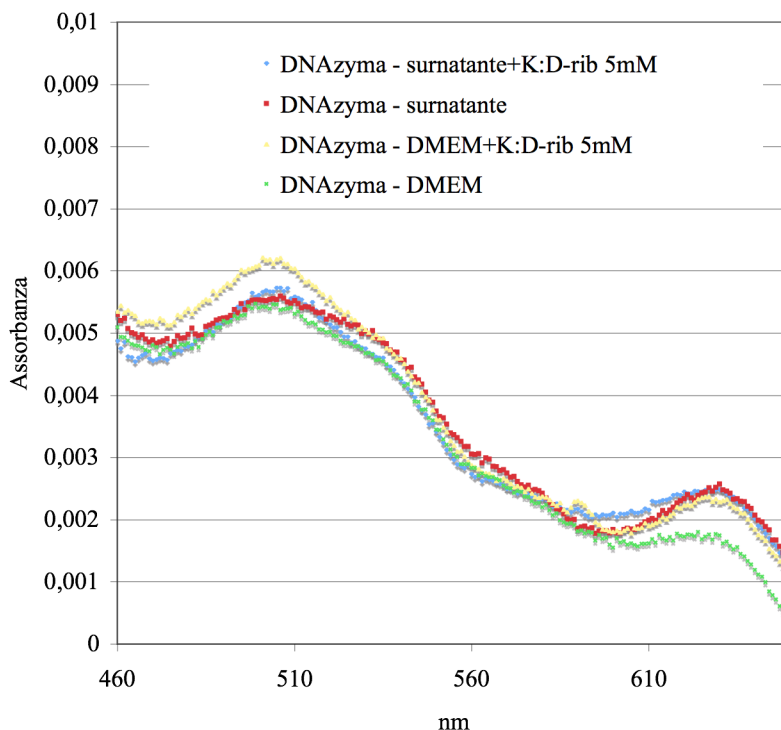


Figura 4.14: Ingrandimento 10X delle componenti a 502 nm e 629 nm del DNAzima, relative agli spettri precedenti.

4.6 SPETTRI DICROISMO CIRCOLARE

Il Dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica utilizzata per analizzare le caratteristiche strutturali della sequenza oligonucleotidica ricca in guanine PS2.M. Abbiamo usato questa tecnica per verificare il cambiamento conformazionale della struttura. Come è riportato in figura 4.16, il folding è stato studiato utilizzando diverse concentrazioni di KCl, da 10 mM fino a 100 mM ed acquisiti a temperatura ambiente. La regione dello spettro che interessa è la regione UV. Lo spettro relativo al folding di PS2.M in presenza di una concentrazione di KCl 10 mM, mostra un picco di assorbimento a 293 nm. Mentre non mostra un assorbimento significativo a 260 nm e nemmeno un assorbimento negativo nella regione attorno a 243 nm. Aumentando via via le concentrazioni di KCl, come atteso, gli assorbimenti cambiano. Aumenta il picco nella regione attorno a 260 nm, diminuisce l'assorbimento attorno a 290 nm ed aumenta via via l'assorbimento negativo nella regione attorno a 243 nm. Alla concentrazione di 100 mM di KCl si registra un picco d'assorbimento a 263 nm ed un picco negativo a 243 nm e l'assorbimento a 293 è diminuito significativamente. E' evidente l'esistenza di due strutture che interconvertono all'aumentare della concentrazione di KCl.

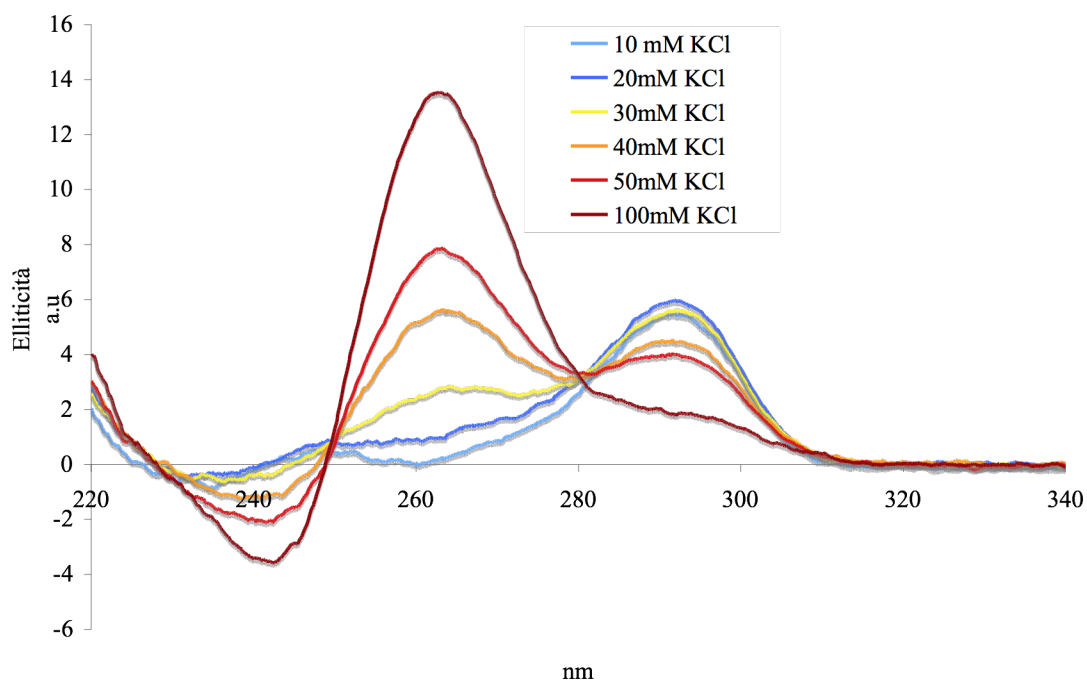


Figura 4.15: Spettri CD dell'oligonucleotide PS2.M foldato a diverse concentrazioni di KCl da 10 mM a 100 mM. A 10 mM di KCl il folding è antiparallelo (spettro azzurro). A 100mM di KCl il folding del PS2M è parallelo (spettro bordeaux). A concentrazioni intermedie abbiamo coesistono entrambe le strutture.

Rappresentando il figura 4.16 la differenza tra l'assorbimento a 262 nm quello a 291 nm per ogni spettro in funzione della concentrazione di KCl abbiamo rappresentato la variazione tra le due componenti e individuato nel range tra 30 mM e 40 mM KCl il punto di flesso cioè la maggior variazione.

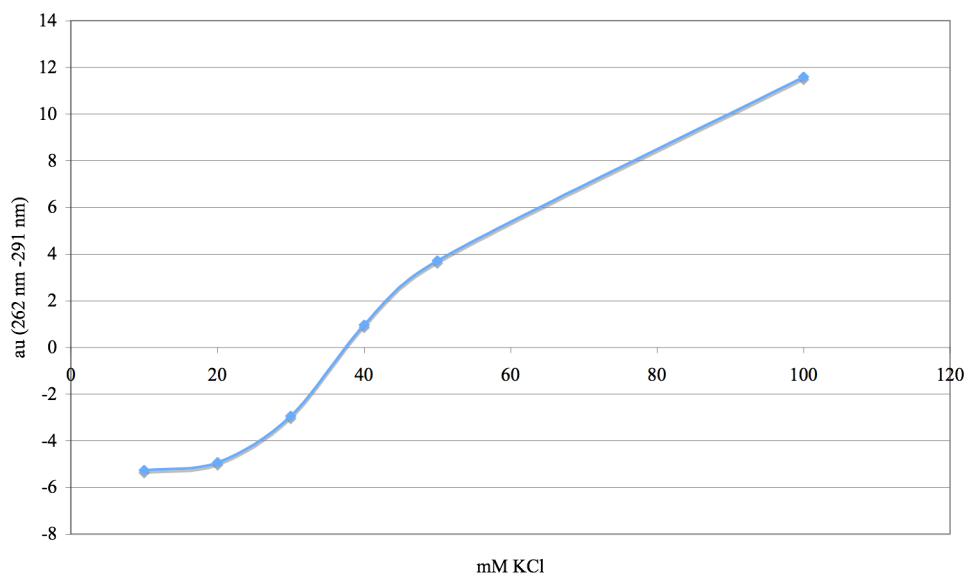


Figura 4.16: Differenza tra l'assorbimento a 26 nm quello a 291 nm per ogni spettro della figura 4.15 in funzione della concentrazione di KCl.

Lo scopo dei due successivi capitoli (4.7 e 4.8), è di dare un outlook delle osservazioni eseguite con tecnica AFM e delle informazioni derivate da dette osservazioni. Sono illustrate immagini rappresentative delle linee cellulari studiate nelle varie condizioni e stati, previsti dai protocolli di studio.

4.7 ANALISI MORFOLOGICA DELLA LINEA CELLULARE Hs 578T

La linea cellulare Hs 578T, carcinoma mammario umano, è stata trattata per sette giorni con K:D-rib alla concentrazione di 5mM. La morfologia cellulare è stata poi analizzata tramite microscopia a forza atomica (AFM - ParkXE100) in modalità *non contact* ed in aria.

In figura 4.17 è riportata l'immagine di un campo di una porzione del supporto di crescita cellulare e delle relative cellule di controllo, fissate e colorate con giemsa. Quest'immagine è stata acquisita attraverso l'utilizzo del microscopio ottico, accoppiato con quello a forza atomica.

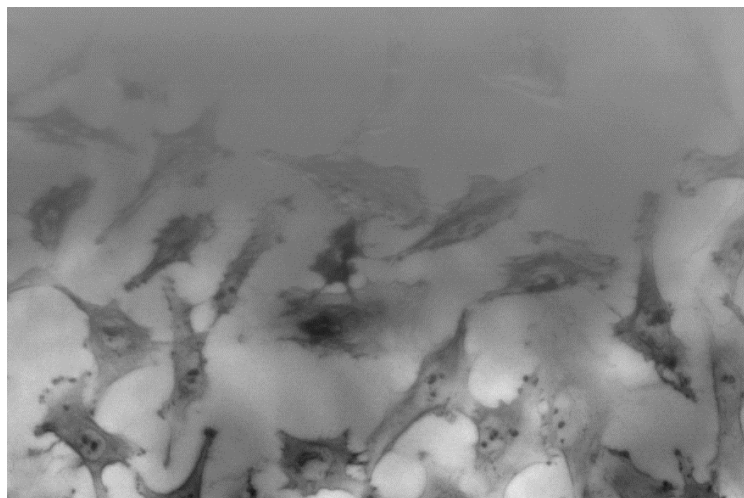


Figura: 4.17 Immagine acquisita al microscopio ottico delle cellule Hs 578T di controllo, dopo una settimana in coltura. Le cellule sono state fissate con PFA al 4% e colorate con Giemsa, per ottimizzare la visualizzazione.

Di seguito saranno riportate le immagini delle regioni perinucleari, delle regioni prossimali alla regione perinucleare ed un punto di connessione tra la cellula ed il supporto di crescita delle cellule di controllo. Le immagini sono state acquisite mediante AFM. Nella figura 4.18 A e 4.18 B è riportato lo stesso distretto cellulare. L'immagine in figura 4.18 B rappresenta un particolare dell'immagine A. Le zone più chiare indicano l'avvicinamento al nucleo, in quanto regioni con altezze maggiori. In figura 4.18B questo è più evidente allontanandoci dal nucleo. Nella figura 4.18 A sono maggiormente visibili le porzioni citoscheletriche, in particolare nella regione più lontana al nucleo. Nella figura 4.18 B è più dettagliata la struttura della membrana plasmatica. Nella figura

4.18C è riportata la scansione di una regione cellulare lontana dal nucleo. Qui sono visibili le strutture utilizzate dalla cellula per la connessione con il supporto su cui sono fatte crescere. Apparentemente la membrana plasmatica ha un aspetto più regolare e sono visibili le strutture citoscheletriche intimamente connesse alla membrana stessa.

Nella figura 4.18 D è stata fatta la scansione di una porzione della regione perinucleare di una cellula, in si possono riconoscere i riarrangiamenti della membrana plasmatica. Inoltre è visibile una porzione del nucleo sottostante la membrana plasmatica. Questa sembra una regione dalla struttura apparentemente regolare.

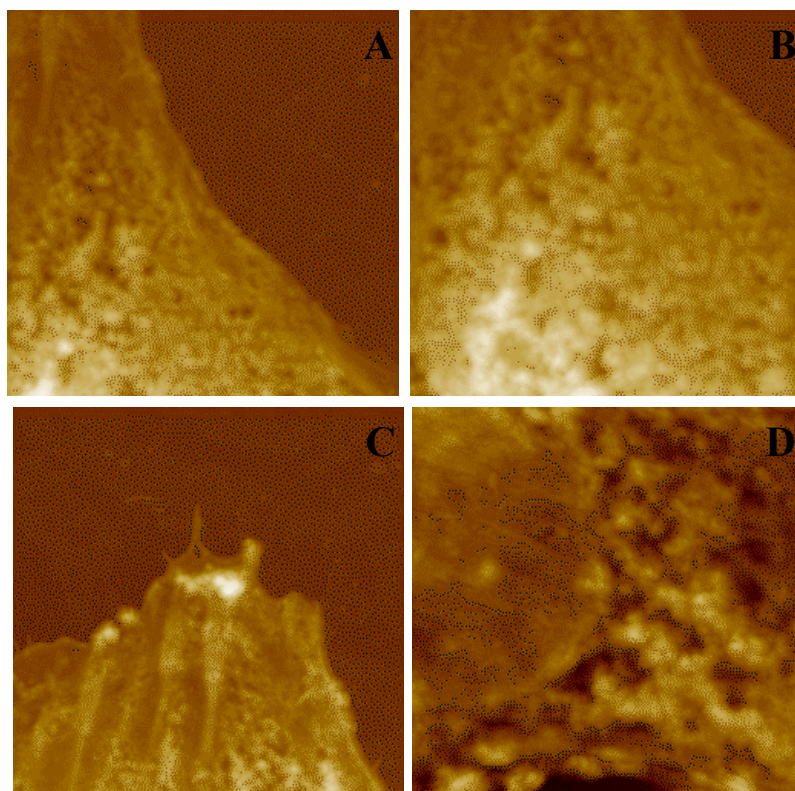


Figura 4.18: Immagini AFM della linea cellulare Hs 578T. Sono qui riportate cellule di controllo (non trattate). A) Regione intermedia tra nucleo ed estremità cellulare di $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$. B) Particolare dell'immagine A prossimale al nucleo, di $16,43\ \mu\text{m} \times 16,43\ \mu\text{m}$. C) Estremità della cellula con protrusioni verso il supporto di crescita, di $16,43\ \mu\text{m} \times 16,43\ \mu\text{m}$. D) Particolare della regione perinucleare inclusa una porzione del nucleo sottostante, di $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$.

Nelle figure 4.19 - 4.22 sono riportate le visualizzazioni 3D delle immagini mostrate precedentemente nella figura 4.18. Queste sono ottenute grazie al software di analisi immagini XEI (Park). Nell'immagine tridimensionale è riportata l'area della regione scansionata, asse x ed asse y , ed ad un'estremità dell'area è associata la barra delle altezze o asse z a cui è associata come per

l'immagine bidimensionale la scala d'intensità del colore. Se il colore è più chiaro, abbiamo strutture più alte, mentre se il colore è più scuro le parti incluse nella scansione sono più basse. Utilizzando queste visualizzazioni sono facilmente individuabili le componenti cellulari e le relative altezze. Nella visualizzazione 3D è perfettamente visibile come cambia la struttura della membrana plasmatica, passando da un'area distale il nucleo ad un'area della membrana plasmatica perinucleare.

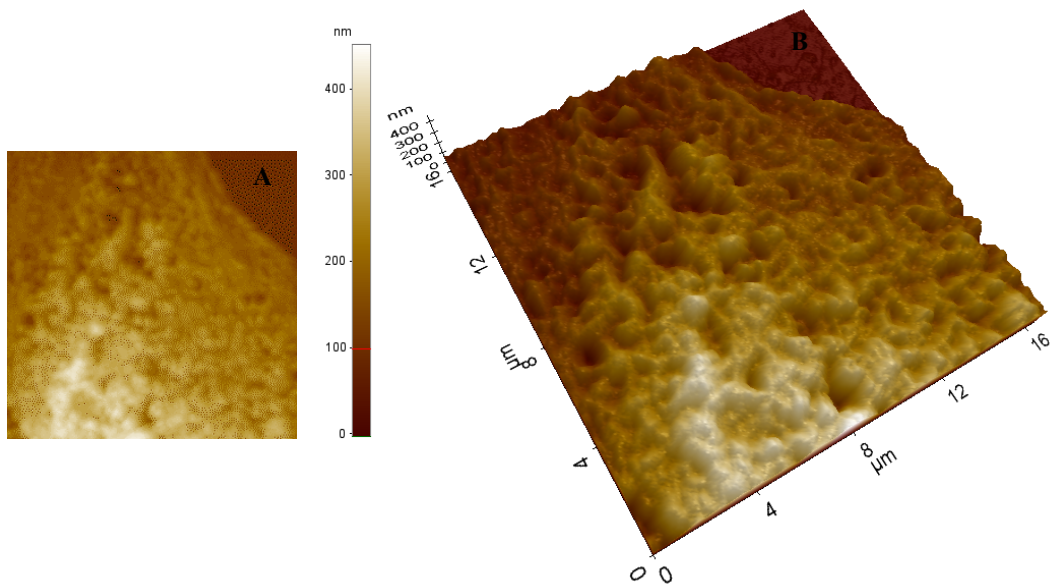


Figura 4.19: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze

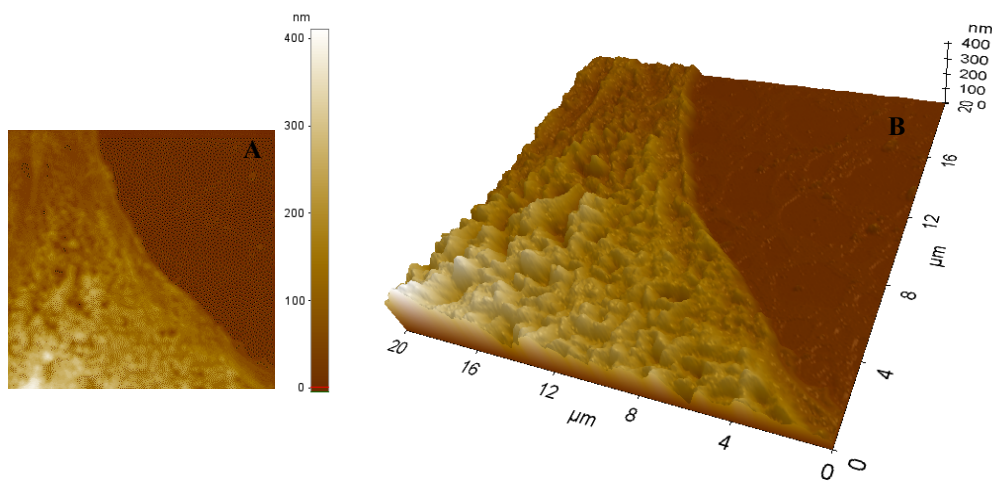


Figura 4.20: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze

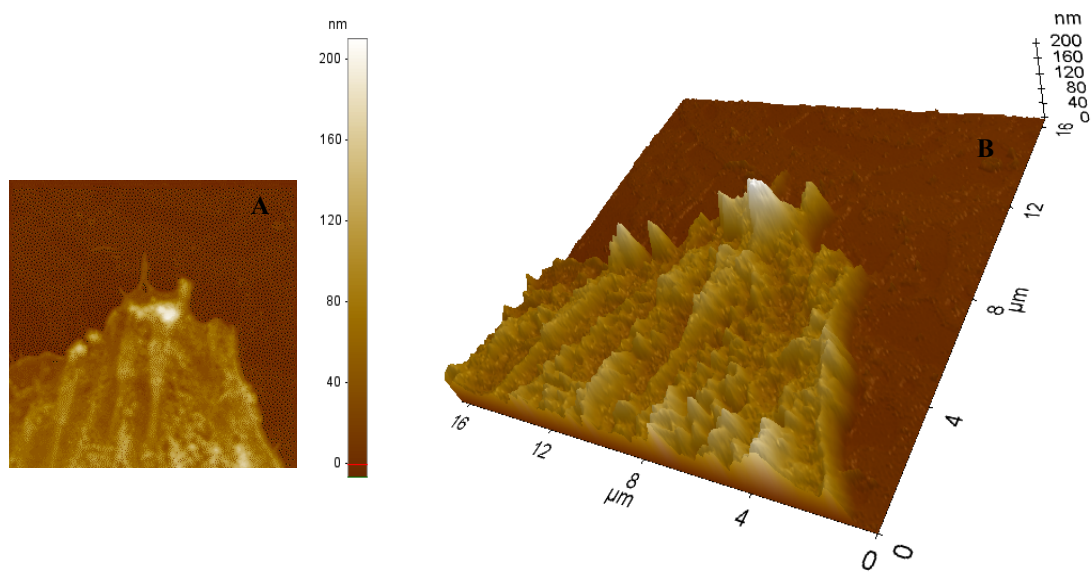


Figura 4.21: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze

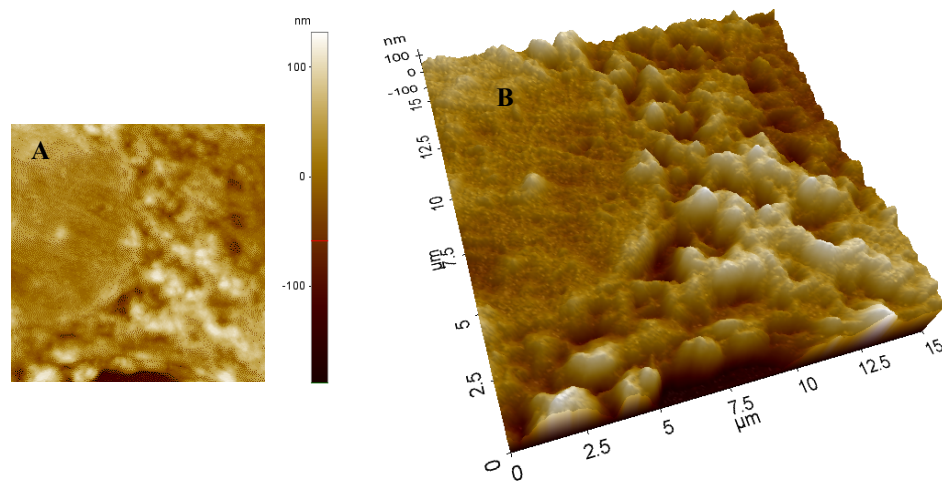


Figura 4.22: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze

Un maggior dettaglio della topografia cellulare deriva dal *line profile* applicato alle immagini mostrate in precedenza. Il *line profile* è il profilo topografico di una linea facente parte della figura. Si possono conoscere le dimensioni delle strutture incluse nel profilo topografico, grazie all'utilizzo di cursori che permettono di selezionarle con accuratezza.

In figura 4.23 sono state selezionate le fibre citoscheletriche connesse alla membrana plasmatica. I due *line profile* paralleli come cambia la topografia delle stesse fibre nell'arco di circa 2 μm . Spostandoci da sinistra verso destra la linea verde ha selezionato tre fibre citoscheletriche di

ampiezza di 1,7 μm e le altre due misurano 1,5 μm . Tramite il *line profile* rosso, in direzione zona perinucleare, seleziona te altre tre fibre di 1.3 μm , 2.1 μm e 2.0 μm .

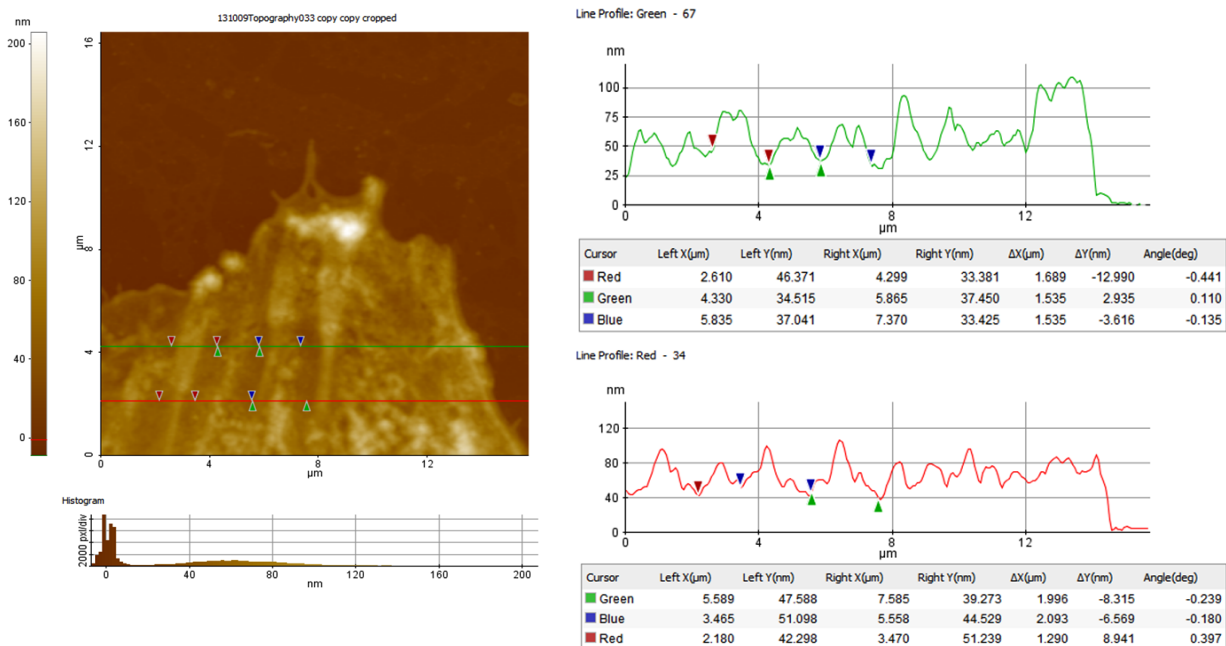


Figura 4.23: In figura sono riportati due *Line profile* (uno rosso e l'altro verde) appartenenti ad una regione distante il nucleo di una cellula di controllo. A destra dell'immagine della cellula sono riportati profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm .. Sono riportate le larghezze di due fibre citoscheletriche vicine per entrambi i *line profile*.

In figura 4.23 è riportata la scansione di una porzione della regione distale il nucleo. Utilizzando i due *line profile* si sono selezionate due strutture somiglianti tra di loro apparentemente a cavità. Grazie ai cursori si sono caratterizzate le ampiezze e le profondità. L'andamento dei profili, con le altezze sempre maggiori, indica che ci si sta dirigendo verso l'area della membrana plasmatica con il nucleo sottostante e che seguendo il *line profile* verde la pendenza è maggiore. La struttura selezionata con il *line profile* verde mostra un'ampiezza di 1,7 μm ed una profondità poco maggiore di 150 μm , avendo posizionato il cursore verde all'interno della cavità. Il fondo di questa cavità è 38,1 nm rispetto al supporto di crescita cellulare. La struttura selezionata dal il *line profile* rosso mostra un'ampiezza di 1,8 μm ed una profondità di circa 80 nm. Come prima si è posizionato il cursore verde all'interno della cavità. Il fondo di questa cavità è 26,9 nm rispetto al supporto di crescita cellulare. La seconda struttura selezionata tramite il *line profile* rosso, si trova ad un'altezza superiore rispetto alle altre. Mostra un'ampiezza di 2,187 μm ed una profondità di circa 50 nm posizionando il cursore verde all'interno della cavità. Il fondo di questa cavità è 151,466 nm rispetto al supporto di crescita cellulare.

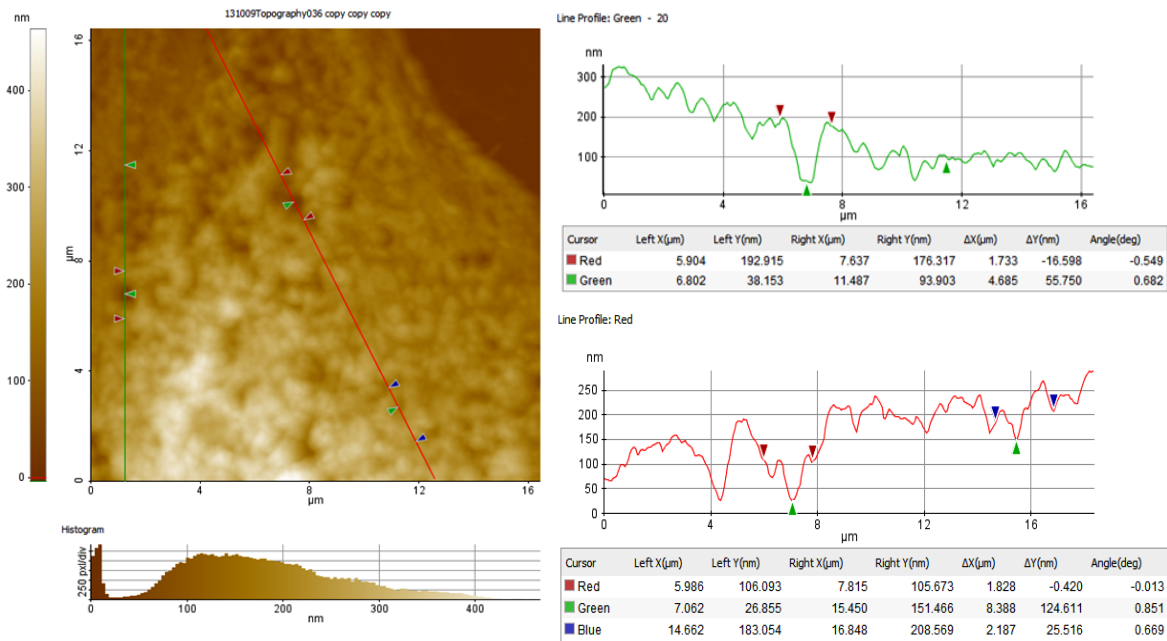


Figura 4.24: In figura sono riportati due *line profile* (uno rosso e l'altro verde) appartenenti ad una regione distale il nucleo, appartenente ad una cellula di controllo. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in mm. Sotto ad entrambi i grafici, è riportata la larghezza della struttura e la profondità.

In figura 4.24 è stata selezionata la regione perinucleare. Tramite i due *line profile* si sono selezionate ancora una volta strutture appartenenti alla membrana fosfolipidica. Le strutture incluse nel *line profile* rosso mostrano un andamento simile. I riarrangiamenti della membrana originano strutture fiancheggianti l'una all'altra ma di difficile caratterizzazione, come dimostra l'andamento della regione al di fuori della membrana plasmatica con il nucleo sottostante. È una regione in cui la membrana plasmatica è fortemente riarrangiata. Le strutture selezionate con il *line profile* verde apparentemente sembrano più regolari e di facile identificazione. In realtà la struttura selezionata tramite i cursori blu, mostra un'ampiezza di 2,2 μm ed una profondità di poco più di 40 nm, data dal cursore verde (destra). Siccome le strutture adiacenti quella selezionata tramite i cursori blu sono di difficile definizione sono stati posizionati i cursori rosso (destra) e verde (sinistra) al loro interno, così da caratterizzare le distanze tra le profondità. I punti tra il cursore verde ed il rosso distano 2.4 μm, mentre tra il cursore rosso (destra) ed il cursore verde (sinistra) distano 1.6 μm. I *line profile* e le misure ottenute sono coerenti con i dati provenienti dalla misura dei citoscheletro, mostrato in figura 4.23.

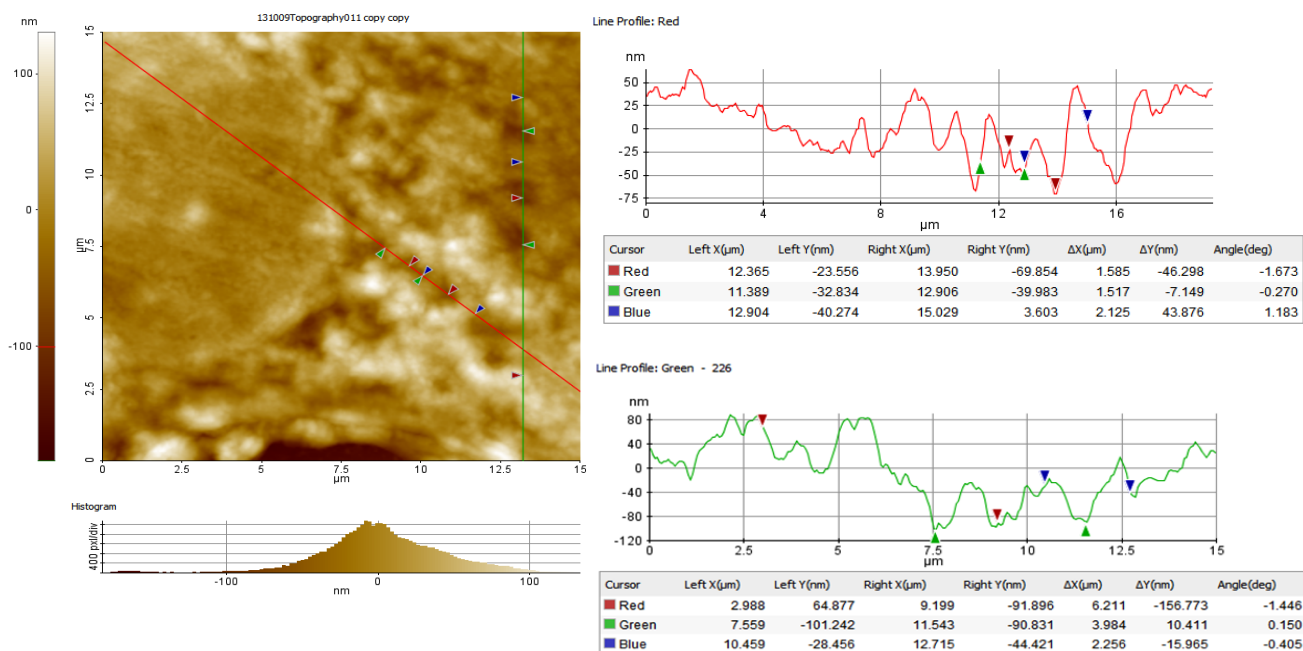


Figura 4.25: In figura sono riportati due *Line profile* (uno rosso e l'altro verde) appartenenti alla regione perinucleare di una cellula di controllo. A destra dell'immagine della cellula sono riportati profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Per ogni *line profile* sono state selezionate particolari riarrangiamenti della membrana citoplasmatica. Sotto al grafico sono riportate le ampiezze e le profondità delle strutture selezionate.

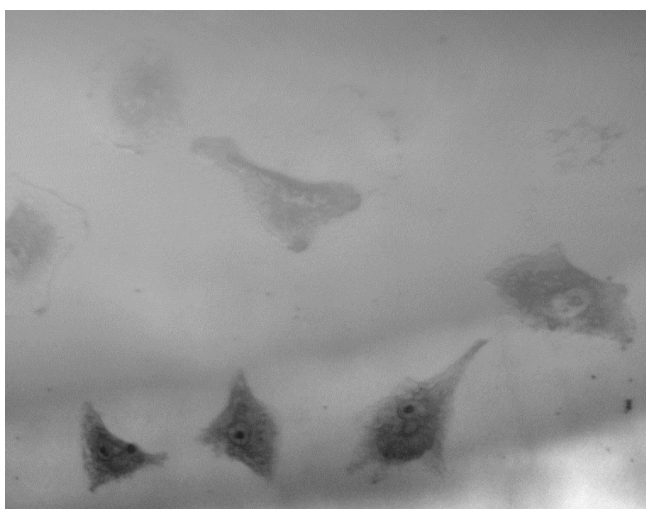


Figura 4.26: Immagine acquisita al microscopio ottico delle cellule Hs 578T dopo una settimana di trattamento con K:D-rib 5mM. Le cellule fissate con PFA al 4% e colorate con Giemsa, per ottimizzare la visualizzazione.

Lo stesso approccio è stato utilizzato per le cellule Hs 578T trattate per una settimana con K:D-rib alla concentrazione di 5mM. In figura 4.26 è riportata l'immagine di un campo di una porzione del supporto di crescita cellulare e delle relative cellule trattate con K:D-rib 5mM, fissate e colorate con giemsa. Quest'immagine è stata acquisita con il microscopio ottico, accoppiato con quello a forza atomica.

Anche in questo caso diverse aree cellulari sono state analizzate, ma con una particolare attenzione volta alla regione perinucleare ed alle regioni adiacenti questa importante zona. Sotto la membrana cellulare adiacente il nucleo si trova il reticolo endoplasmatico rugoso e l'apparato di Golgi, sedi di sintesi proteica e modificazione post-trascrizionale delle proteine. Nella figura 4.27 sono riportati i distretti cellulari analizzati mediante l'utilizzo di AFM appartenenti alla stessa cellula.

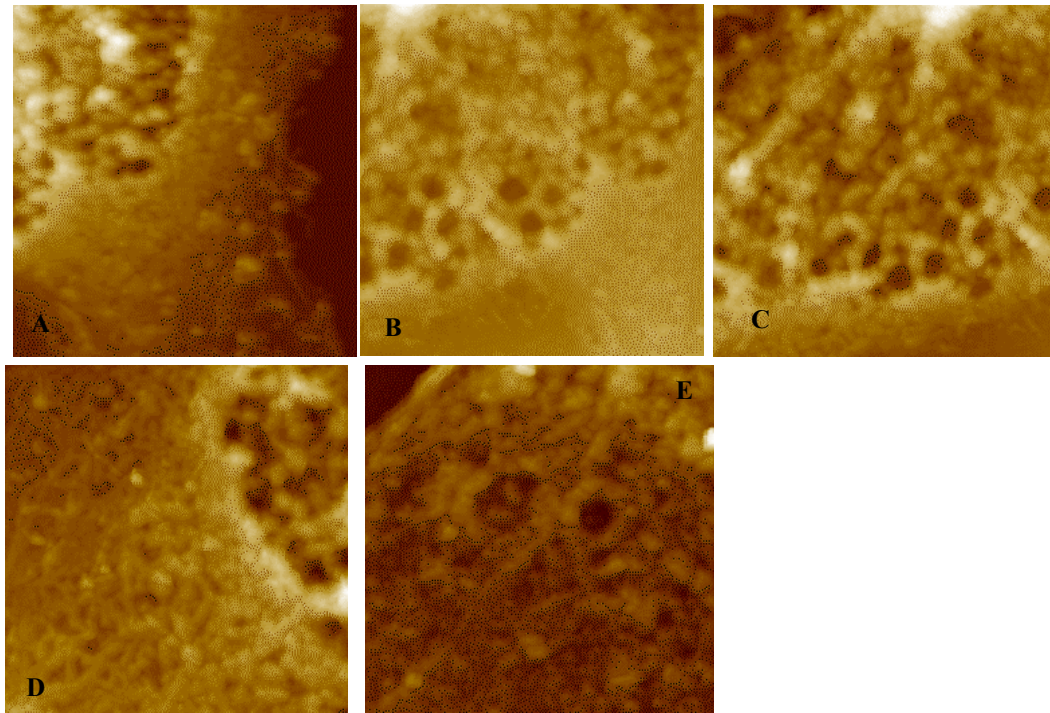


Figura 4.27: Immagini AFM della regione perinucleare di cellule Hs 578T, trattate con K:D-rib 5mM per una settimana.

A) Porzione della regione perinucleare, incluso il bordo della cellula a contatto con il supporto di crescita, di $15,86 \mu\text{m} \times 19,92 \mu\text{m}$. B) Un'altra porzione della regione perinucleare di $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. C e D) Regioni perinucleari adiacenti. Le regioni qui rappresentate appartengono alla stessa cellula. Le regioni scansionate sono $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. E) Immagine AFM di una regione non strettamente perinucleare di una cellula Hs 578T, trattata con K:D-rib 5mM per una settimana, di $13,95 \mu\text{m} \times 14,94 \mu\text{m}$.

La figura 4.27 E rappresenta la scansione di un'area non strettamente perinucleare, appartenente ad una cellula diversa, da quella nella figura precedente. Qui non sono presenti gli stessi riarrangiamenti membranari presenti nelle immagini della figura precedente. Nonostante questo sono comunque evidenti significative modificazioni strutturali.

Le immagini 3D, come descritto in precedenza, ci forniscono maggiori informazioni relative alla tridimensionalità dei riarrangiamenti membranari. Le visualizzazioni 3D mostrano che i riarrangiamenti membranari diventano sempre più numerosi e strutturalmente complessi con il progressivo avvicinarsi al nucleo.

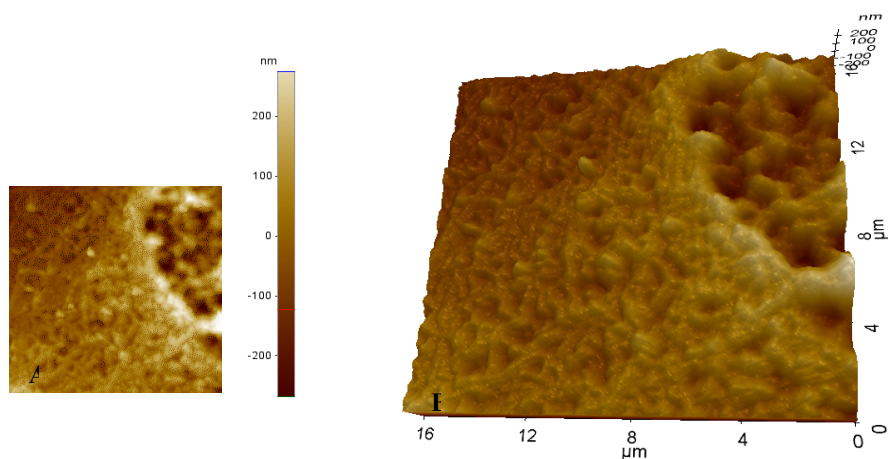


Figura 4.28: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. Qui è riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze.

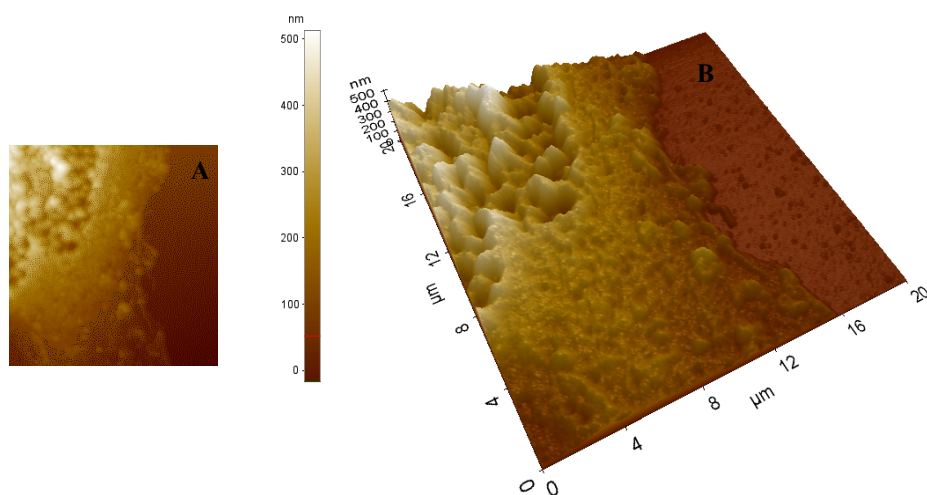


Figura 4.29: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. Qui è riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

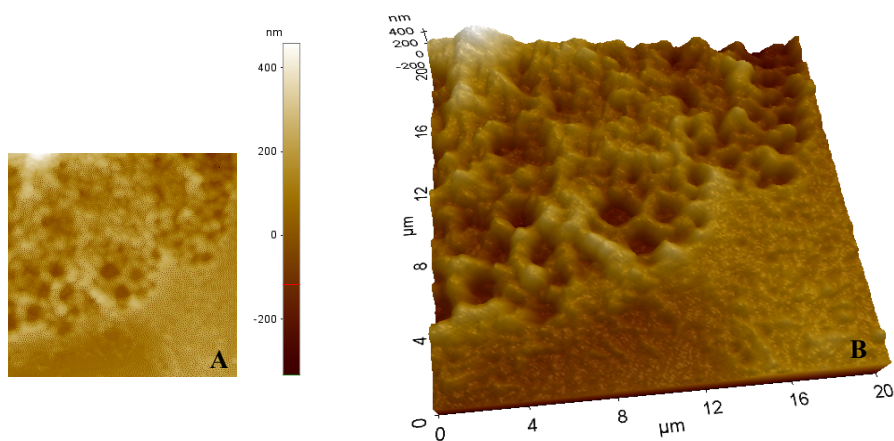


Figura 4.30: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. Qui è riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze.

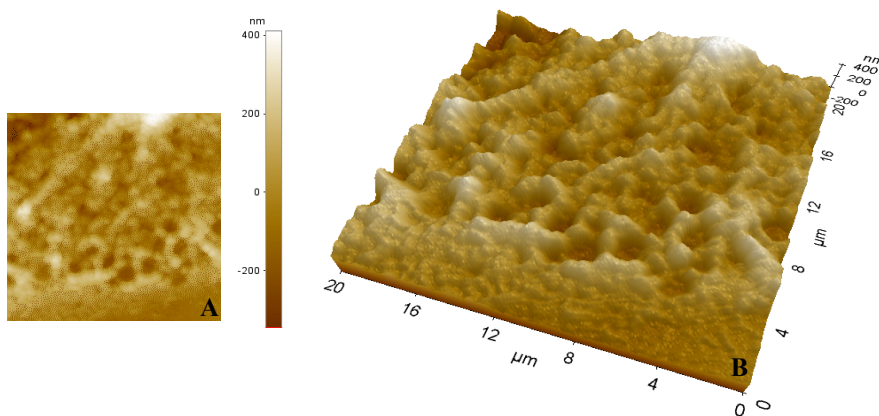


Figura 4.31: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. Qui è riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze.

Nella figura 4.31 è riportata l'immagine tridimensionale della regione associata alla zona perinucleare della cellula. La visualizzazione delle strutture appartenenti alla membrana plasmatica, è comunque rilevante e sono visibili numerose cavità (figura 4.31 B).

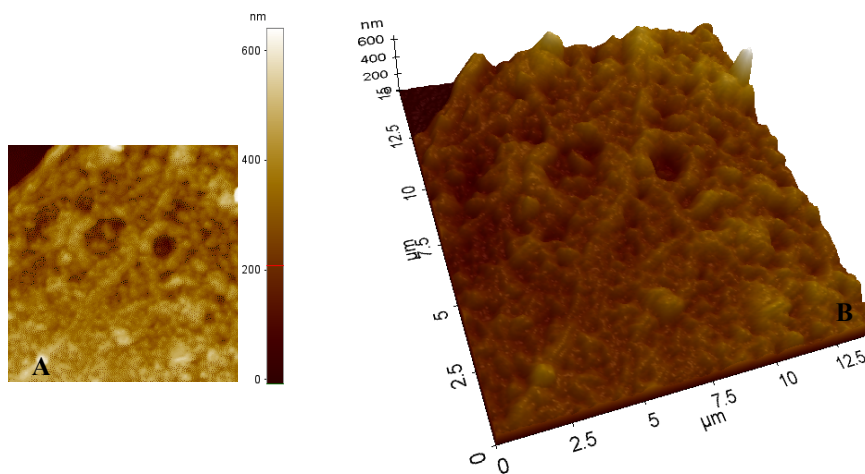


Figura 4.32: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. Qui è riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

I *line profile* mostrano i profili topografici delle regioni scansionate, caratterizzando dimensionalmente le strutture selezionate nell'area di scansione.

Come riportato in figura 4.33 si sono misurate le ampiezze e la profondità di due strutture simili a quelle selezionate nelle cellule di controllo. Il *line profile* rosso seleziona due cavità importati e dalla struttura complessa. La prima cavità definita dai cursori rossi, mostra dimensioni pari a 4,1

μm . L'interno ha una superficie rugosa difficilmente caratterizzabile se non per il dislivello rispetto alle strutture che lo contornano. Il punto a profondità maggiore è a circa 150 nm dalla superficie. La seconda struttura selezionata dai cursori verdi ha una larghezza di $3,2 \mu\text{m}$. Anche la profondità di questa "cavità" diventa difficile da caratterizzare come si evince dal *line profile* dell'area selezionata all'interno dei cursori verdi, in quanto l'interno è irregolare e formato da ulteriori strutture. L'invaginazione della membrana arriva a 50 nm dal substrato di crescita cellulare.

Il *line profile* verde seleziona riarrangiamenti strutturali diversi rispetto alle due precedenti. La struttura sembra meno complessa e più regolare. La prima cavità definita dai cursori rossi, mostra una larghezza di $2,4 \mu\text{m}$. Definire l'interno è più semplice ed il punto a profondità maggiore è a circa 150 nm dalla superficie (cursore blu sinistro). La seconda struttura selezionata dai cursori verdi ha una larghezza di $1,7 \mu\text{m}$. Anche la profondità di questa "cavità" è semplice da caratterizzare ed è a circa 100 nm dalla superficie cellulare (cursore blu destro).

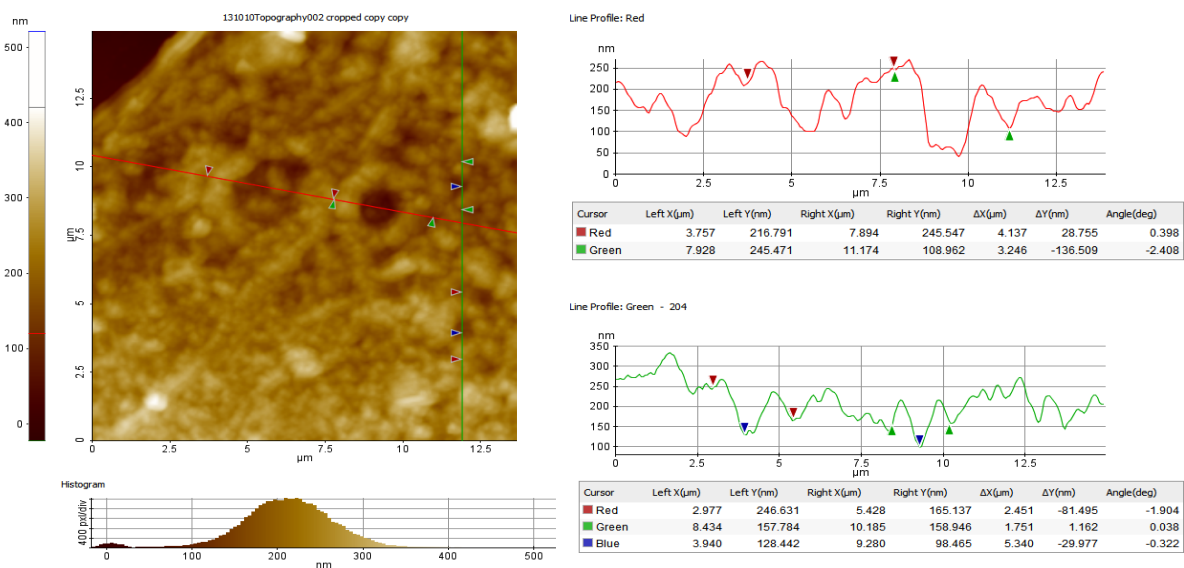


Figura 4.33: In figura sono riportati due *Line profile* (uno rosso e l'altro verde) appartenenti alla regione prossimale alla regione perinucleare, di una cellula Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici di due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Per ogni *line profile* sono state selezionati particolari riarrangiamenti della membrana citoplasmatica.

Nella figura 4.34 è riportata una porzione della regione perinucleare di una cellula trattata. Il *line profile* verde include una regione membranaria fortemente riarrangiata che va da $8 \mu\text{m}$ circa fino a $20 \mu\text{m}$. Mentre il *line profile* rosso include una regione fortemente riarrangiata da $10 \mu\text{m}$ circa fino a $20 \mu\text{m}$. Gli andamenti sono paragonabili ed è interessante notare come siano diverse le due zone, in accordo anche con i *line profile*. I riarrangiamenti selezionati con il *line profile* verde hanno larghezza simile. I cursori rossi selezionano le estremità di un riarrangiamento membranario

ricorrente sia come forma che come dimensione. La larghezza è di $2.7 \mu\text{m}$ mentre la larghezza della struttura adiacente, selezionata tramite i cursori è di $2.2 \mu\text{m}$. Le due strutture sono piuttosto simili come *line profile* e come dimensioni ma non come profondità. I cursori blu sono a circa 50 nm di differenza. Ciò che è stato selezionato dal *line profile* rosso è simile come andamento ma i parametri strutturali sono piuttosto differenti. I due cursori blu selezionano un riarrangiamento strutturale simile ad una rosetta, con un'ampiezza di $2.3 \mu\text{m}$. Tra il cursore verde destro ed il rosso destro, è stata selezionata un altro riarrangiamento strutturale con un'ampiezza di circa $3 \mu\text{m}$. La differenza tra il valore della y del cursore blu destro ed il valore della y del cursore verde sinistro è di $11,9 \text{ nm}$. Questo dimostra che il fondo delle invaginazioni membranarie è simile. Analizzando i valori de cursori nei punti di minimo selezionati da entrambi i *line profile*, all'interno delle invaginazioni, si può notare che c'è una certa coerenza, mentre le estremità distali il nucleo, cursore rosso destro nel *line profile* rosso e cursore verde sinistro nel *line profile* verde, hanno altezze significativamente maggiori.

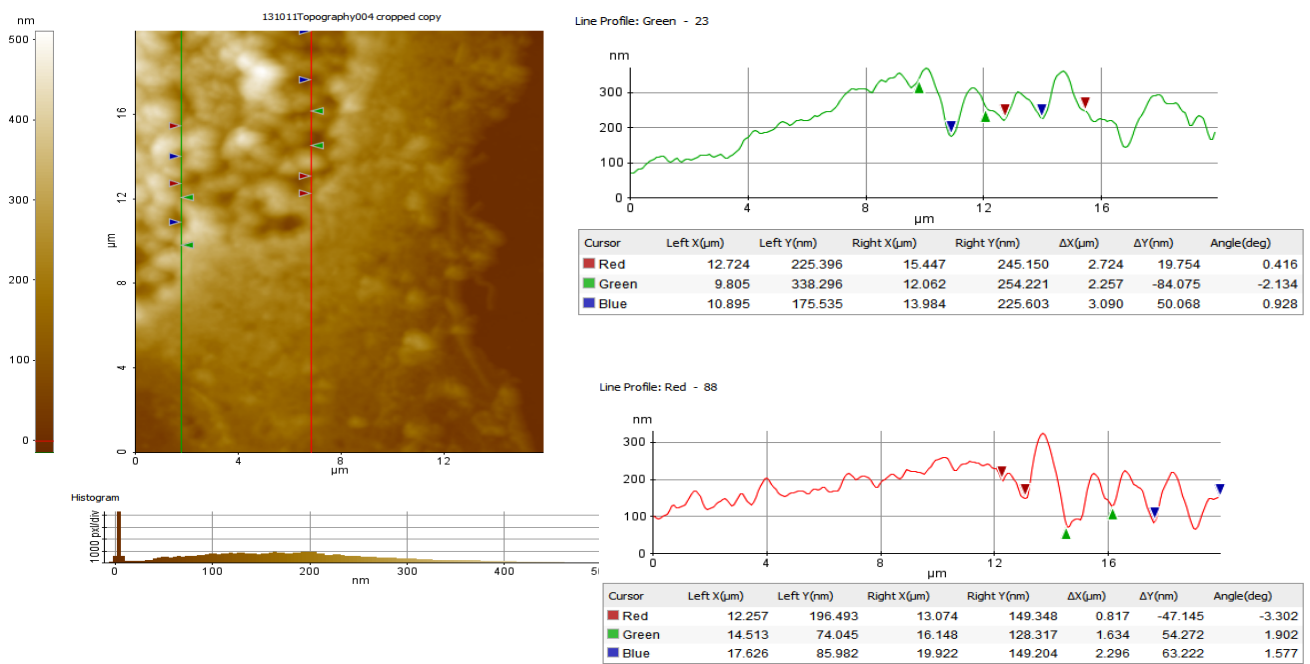


Figura 4:34: In figura sono riportati due *Line profile* (uno rosso e l'altro verde) appartenenti alla regione prossimale alla regione perinucleare, di una cellula Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici di due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Per ogni *line profile* sono state selezionati particolari riarrangiamenti della membrana citoplasmatica. Sotto al grafico sono riportate le ampiezze e le profondità delle strutture selezionate.

In figura 4.35 e 4.36 sono riportate due regioni perinucleari avente una porzione in comune. Sono ben riconoscibili i pattern topografici evidenziati nella figura precedente, selezionati dal *line profile* rosso da $12 \mu\text{m}$ a $20 \mu\text{m}$. I due *line profile* delle regioni perinucleari fortemente riarrangiate e le

regioni esterne adiacenti mostrano profili topografici simili, coerenti con i profili precedentemente mostrati. In figura 4.35 le tre “cavità” selezionate, ascrivibili ad invaginazioni della membrana plasmatica, sono caratterizzabili sia come ampiezza che come profondità. I due cursori rossi mostrano un’ampiezza di 3.2 μm , i verdi selezionano una cavità di 2.9 μm ed i blu una di 2.3 μm .

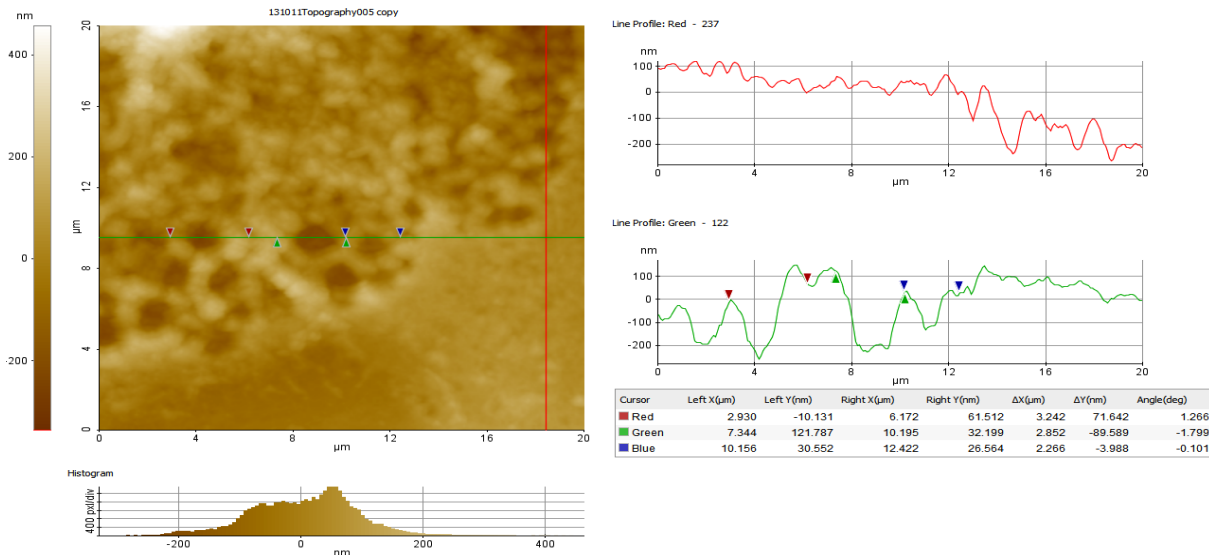


Figura 4.35: In figura sono riportati due *Line profile* (uno rosso e l’altro verde) appartenenti alla regione perinucleare, di una cellula Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM. A destra dell’immagine della cellula sono riportati i profili topografici di due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in mm. Per ogni *line profile* sono state selezionate particolari riarrangiamenti della membrana citoplasmatica. Sotto al grafico sono riportate le ampiezze e le profondità delle strutture selezionate.

La regione selezionata in quest’immagine è adiacente a quella nell’immagine precedente. Ancora una volta troviamo strutture apparentemente simili tra loro e caratterizzate da una sorta di periodicità legata alla regione selezionata. Sono riportati ancora una volta alcuni parametri selezionati grazie all’impiego dei cursori. Tra i 12 μm ed i 16 μm del *line profile verde* si selezionano invaginazioni membranarie regolari e con parametri strutturali simili.

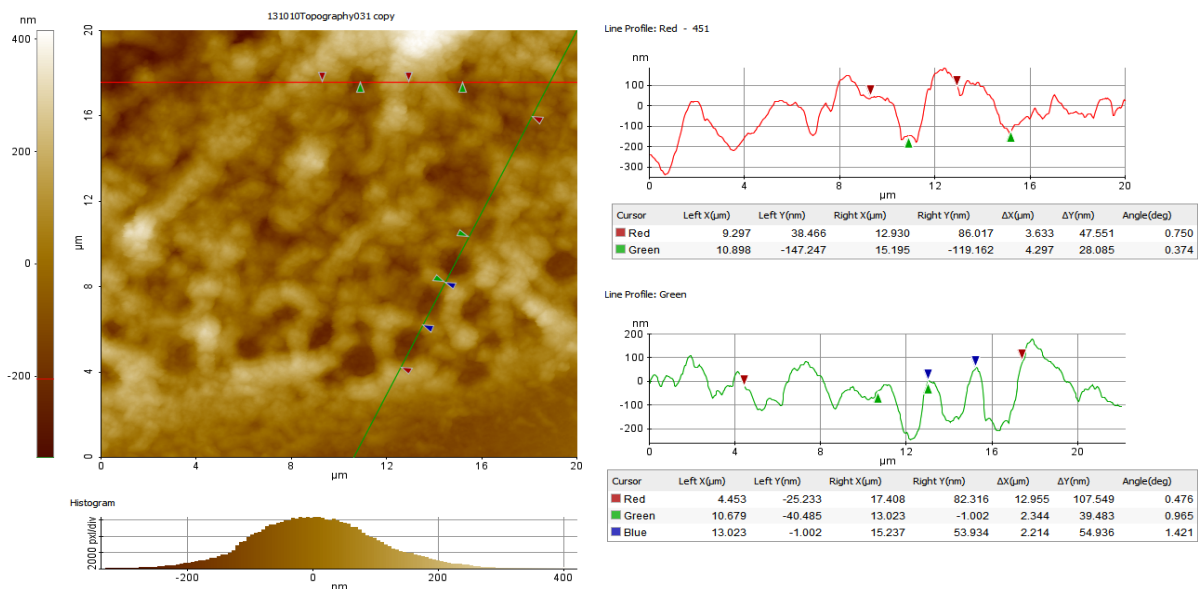


Figura 4.36: In figura sono riportati due *Line profile* (uno rosso e l'altro verde) appartenenti alla regione perinucleare, di una cellula Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici di due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm. Per ogni *line profile* sono state selezionate particolari riarrangiamenti della membrana citoplasmatica. Sotto al grafico sono riportate le ampiezze e le profondità delle strutture selezionate .

In Figura 4.37 sono stati selezionati due *line profile* in cui il verde include la regione perinucleare fortemente riarrangiata e mostra un andamento diverso, rispetto al rosso che si trova nella regione prossimale alla perinucleare. Il *line profile* verde mostra un pattern fortemente irregolare ma diverso rispetto ai pattern delle regioni perinucleari riarrangiate, mostrate nelle figure precedenti. Regioni fortemente riarrangiata caratterizzate da cavità piuttosto grandi. Con i cursori blu si è selezionata una struttura simile a quella selezionata nella figura 4.32. Dimensionalmente è più ampia, 7,3 μm, mentre topograficamente è molto simile. In particolar modo la porzione a sinistra del *line profile* verde è molto simile, mentre la parte destra sembra esser differente.

Il *line profile* rosso mostra un andamento diverso rispetto al verde, in quanto appartenente ad una regione della membrana non fortemente riarrangiata. È evidente una certa irregolarità strutturale, tipica della membrana citoplasmatica.

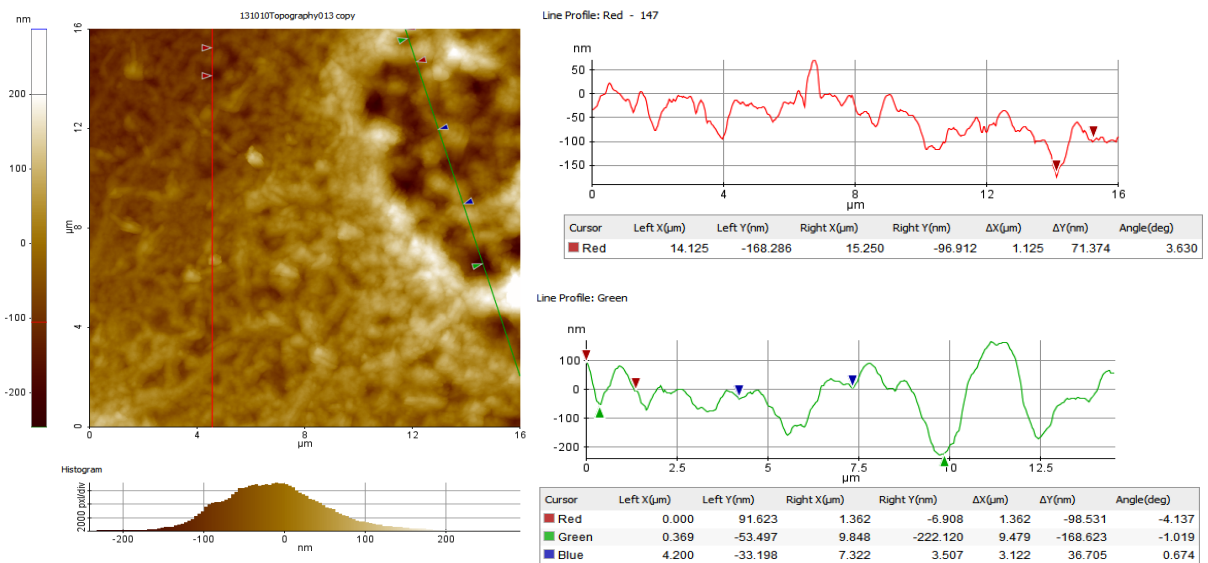


Figura 4.37: In figura sono riportati due *Line profile* di una cellula Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM. Il *line profile* rosso appartiene alla regione prossimale la regione perinucleare, mentre il *line profile* verde appartiene alla regione perinucleare. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici di due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in mm. Per ogni *line profile* sono state selezionate particolari riarrangiamenti della membrana citoplasmatica. Sotto al grafico sono riportate le ampiezze e le profondità delle strutture selezionate.

4.8 ANALISI MORFOLOGICA DELLA LINEA CELLULARE Hs 578Bst IRRAGGIATA E TRATTATA CON K:D-rib

La linea cellulare Hs 578Bst (epitelio mammario umano non tumorale) è stata trattata con K:D-rib 5mM, poi irraggiata con due dosi di raggi X da 2 Gy ciascuna in accordo con i protocolli radioterapeutici convenzionali per il trattamento del carcinoma mammario (ref). La morfologia cellulare è stata poi analizzata tramite microscopia a forza atomica (AFM - ParkXE100) in modalità *non-contact* ed in aria. La tipologia delle immagini è riportata rispettando lo stesso ordine proposto per la linea cellulare Hs 578T.

In figura 4.38 è stata riportata l'immagine, acquisita mediante microscopio ottico, di una cellula di controllo fissata e colorata con Giemsa.

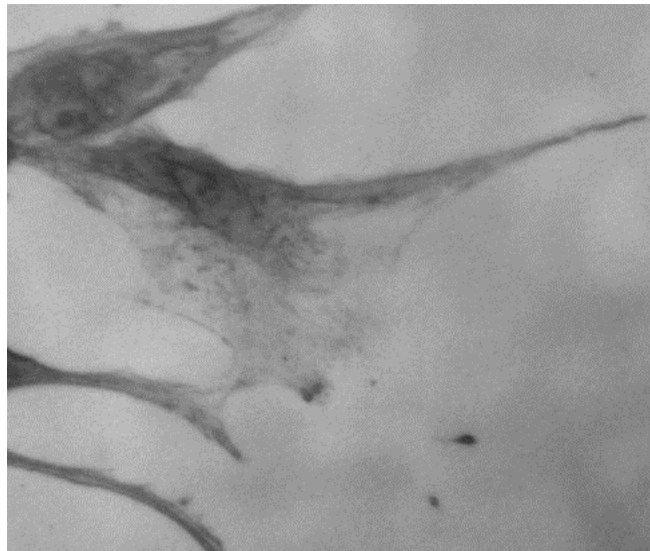


Figura 4.38: Immagine acquisita al microscopio ottico di una cellula Hs 578Bst di controllo. Le cellule sono state fissate con PFA al 4% e colorate con Giemsa, per ottimizzare la visualizzazione al microscopio a Forza atomica.

Le aree cellulari studiate mediante AFM sono state le regioni in cui il citoscheletro è molto evidente, le regioni di connessione fra cellula struttura di crescita cellulare e regioni perinucleari. In figura 4.39 A è riportata la scansione di un'estremità cellulare, in cui sono visibili le strutture citoscheletriche sottostanti ed intimamente connesse con la membrana plasmatica. In figura 4.39 C ci siamo spostati verso il nucleo, ovvero verso sinistra rispetto all'immagine precedente. Nell'area scansionata sono visibili sia le strutture citoscheletriche connesse alla membrana plasmatica che alcune protrusioni cellulari che la cellula utilizza per aumentare l'adesione al substrato di crescita. Da questa immagine inizia ad esser ben evidente una certa direzionalità tra le fibre citoscheletriche.

Nell'immagine 4.39 D si è seguito lo spostamento precedente. Più particolareggiata è la struttura della membrana cellulare e del citoscheletro ad essa connesso. In figura 4.39 C è riportata la scansione dell'area vicinale la precedente. Anche in questa scansione, sono visibili le strutture citoscheletriche ed il bordo della cellula è ben definito.

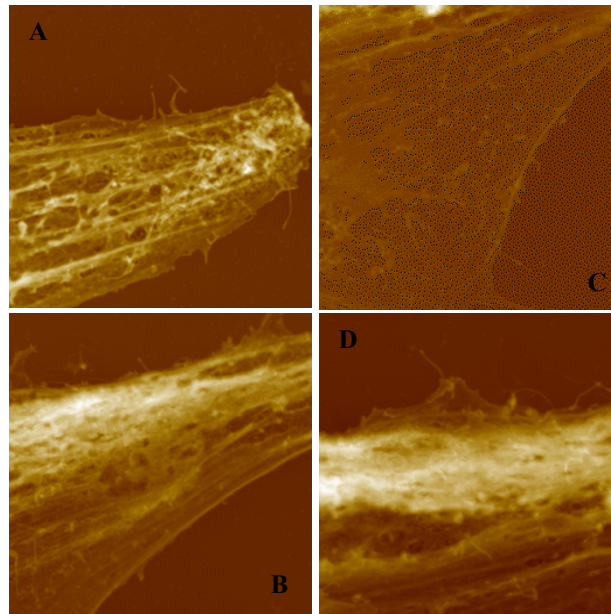


Figura 4.39 Immagini AFM della cellula mostrata in precedenza **A)** Estremità della cellula con visibili le fibre citoscheletriche, di $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$. **B)** Porzione della cellula vicina alla scansione A. Evidenti sempre le fibre ed il bordo cellulare. La scansione è di $24.3\ \mu\text{m} \times 24.3\ \mu\text{m}$. **C)** Porzione sottostante l'immagine in B di $24.3\ \mu\text{m} \times 24.3\ \mu\text{m}$. **D)** Scansione della regione fiancheggiante la parte ad altezza maggiore nell'immagine B inclusa in una porzione del nucleo sottostante, di $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$.

Come per la linea cellulare Hs 578T, la visualizzazione tridimensionale ci fornisce dettagli strutturali importanti, per avere una visualizzazione d'insieme dell'area scansionata.

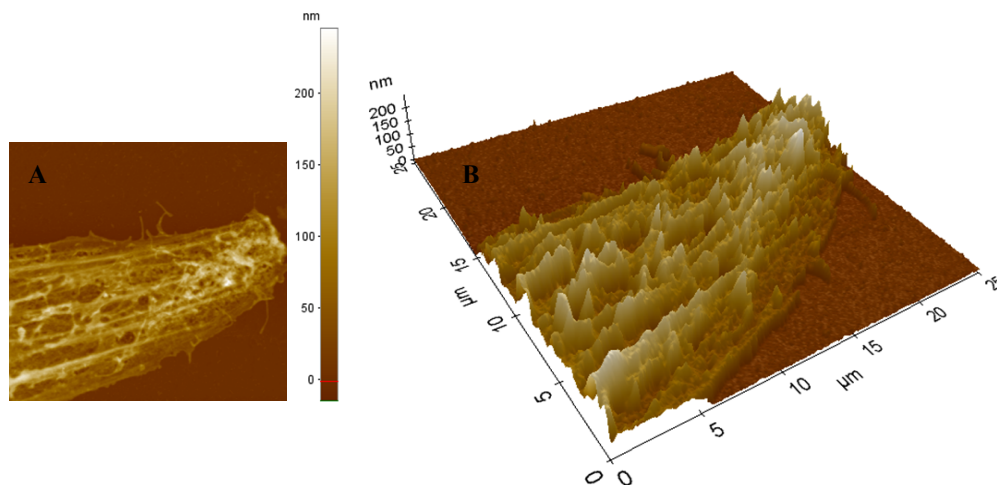


Figura 4.40 **A)** Immagine AFM bidimensionale. **B)** Visualizzazione della stessa immagine in 3D. E riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra riportata la barra delle altezze.

In figura 4.40 sono presenti maggiori dettagli riguardo le fibre citoscheletriche e la loro direzionalità ed è ben visibile il bordo cellulare. L'immagine tridimensionale mostra anche le connessioni con il supporto di crescita.

In figura 4.41 i *line profile* dell'immagine 4.40 ci forniscono un'informazione dettagliata circa la topografia cellulare. È presente una forte irregolarità in entrambi i *line profile* analizzati, che sottintende una certa complessità nella struttura citoscheletrica della cellula. Tramite i *marker* rossi si è in grado di misurare la differenza tra un estremo e l'altro del *line profile*. In accordo con il *line profile* rosso abbiamo una differenza di 24.8 nm mentre quello verde di 12 nm. Il bordo della cellula, ben visibile nella figura 4.3 B misura 38.7 nm.

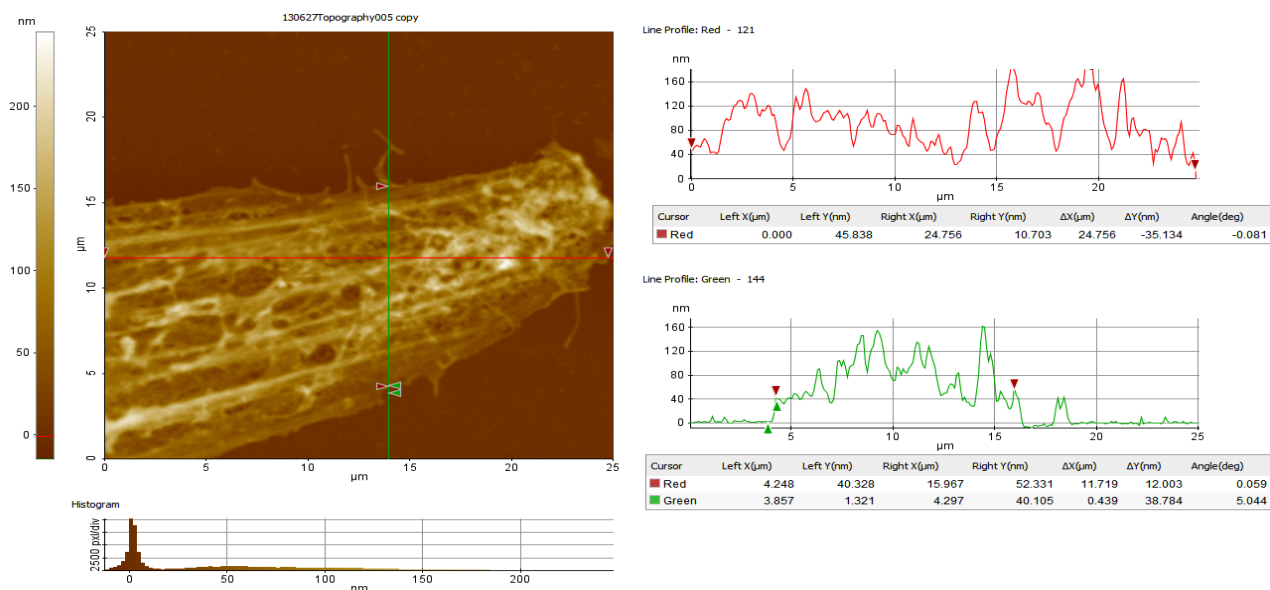


Figura 4.41 Sono riportati due *line profile* perpendicolari tra di loro ed appartenenti all'estremità della cellula con evidenti fibre citoscheletriche ed una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 25 μm x 25 μm. A destra dell'immagine sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm. Sotto ad entrambi i grafici, è riportata la larghezza della struttura e la profondità.

In Figura 4.42 B, è riportata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.42 A. Questa è la regione a fianco l'area cellulare in figura 4.41. È visibile il bordo cellulare e l'andamento delle fibre

citoscheletriche. Inoltre è evidente la complessità dell'architettura citoscheletrica e la precisa direzionalità.

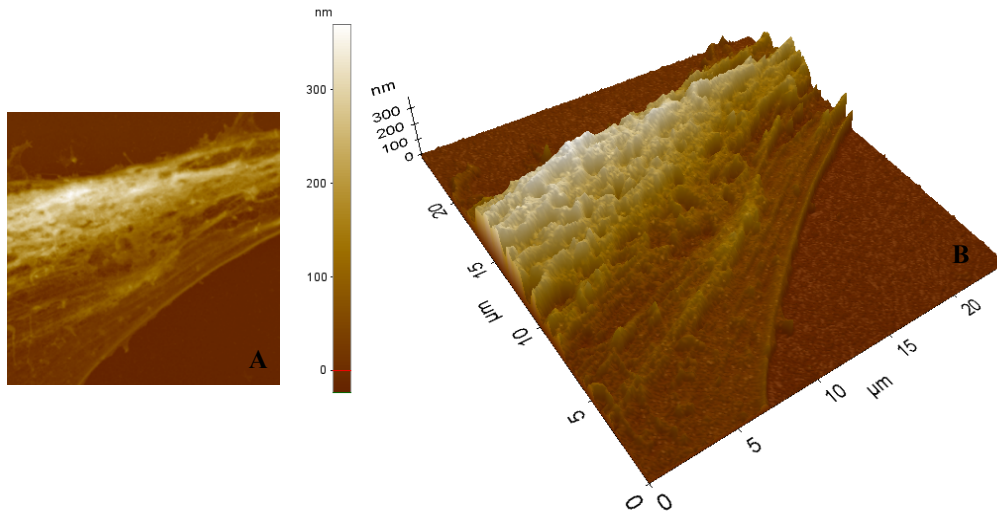


Figura 4.42 A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine tridimensionale. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.43 sono rappresentati due *line profile* relativi all'immagine 4.42. Il profilo rosso mostra l'andamento relativo la diagonale,. I *marker* misurano la differenza di altezze all'intero di una regione relativamente omogenea di 19.5 μm ed è di 66.9 nm. Il *line profile* verde mostra l'andamento di una sezione dell'immagine. La differenza in altezza dei punti selezionati dal cursore rosso (11 μm) è di 46.5 nm.

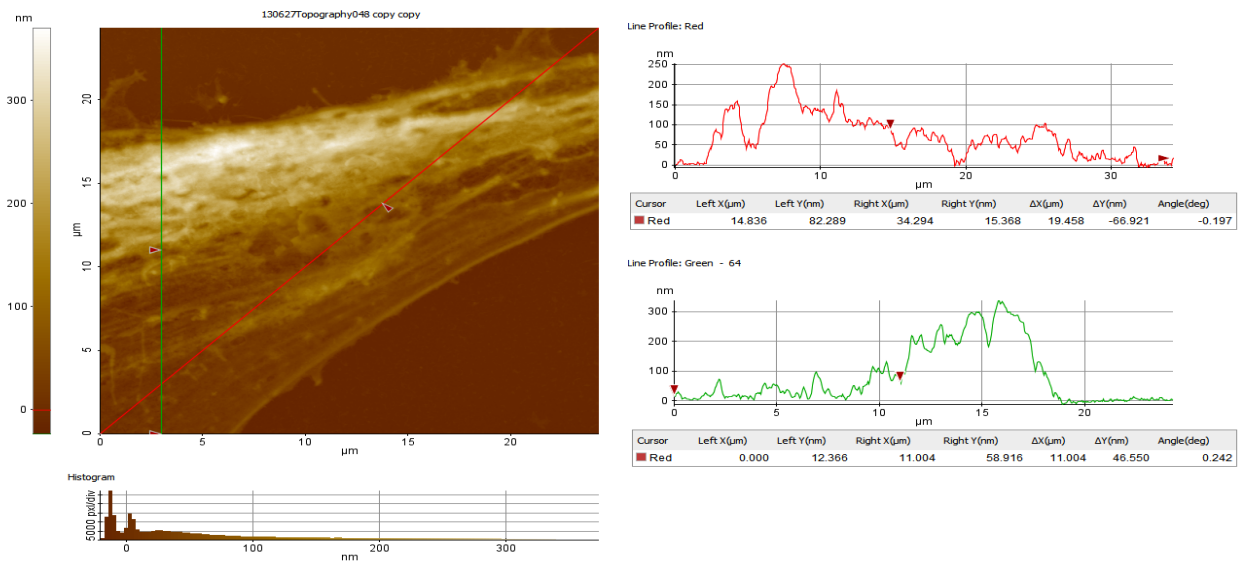


Figura 4.43: Sono riportati due *line profile* appartenenti all'estremità della cellula con visibili le fibre citoscheletriche. Le dimensioni della regione sono 24.3 μm x 24.3 μm. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse *y*) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse *x*) i cui valori sono espressi in μm. Sotto ad entrambi i grafici, è riportata la larghezza della struttura e la profondità.

In Figura 4.44 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.44 A, porzione cellulare fiancheggiante la regione riportata nel set di figure precedenti. Si riconosce perfettamente la porzione della cellula più alta ed una più bassa, in accordo con la visualizzazione precedente.

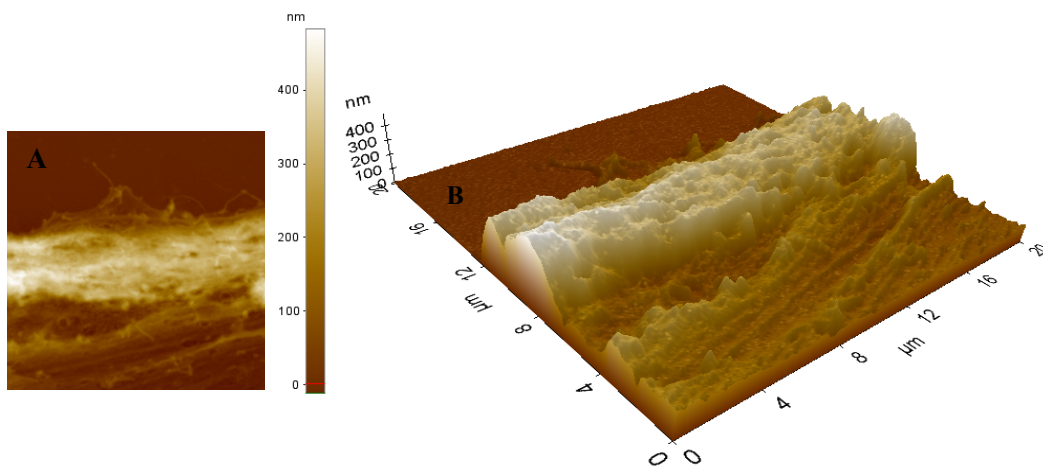


Figura 4.44 A) Immagine AFM bidimensionale. **B)** Visualizzazione della stessa immagine tridimensionale. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

Nella figura 4.45 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.44. Con i *marker* rossi vengono selezionate le regioni dell'area ad altezza maggiore e ne viene misurata l'ampiezza. Il *line profile* rosso mostra un'ampiezza di 7.4 μm mentre quello verde mostra un'ampiezza di 9.1 μm.

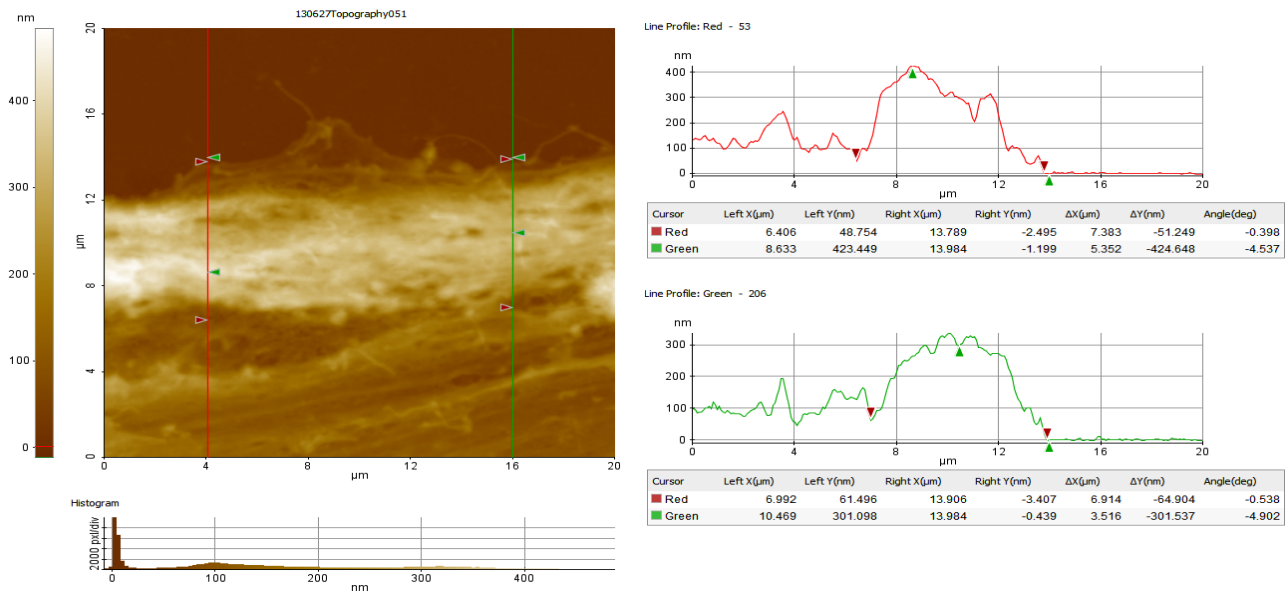


Figura 4.45 In figura sono riportati due *line profile* appartenenti ad una regione eterogenea dell'area cellulare in questione. Sono visibili le fibre citoscheletriche ed alcune strutture membranarie. La sezione è di $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Sotto ad entrambi i grafici, è riportata la larghezza della struttura e la profondità.

In figura 4.46 B è riportata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.46A. Si nota molto bene i bordo cellulare nella parte più omogenea.

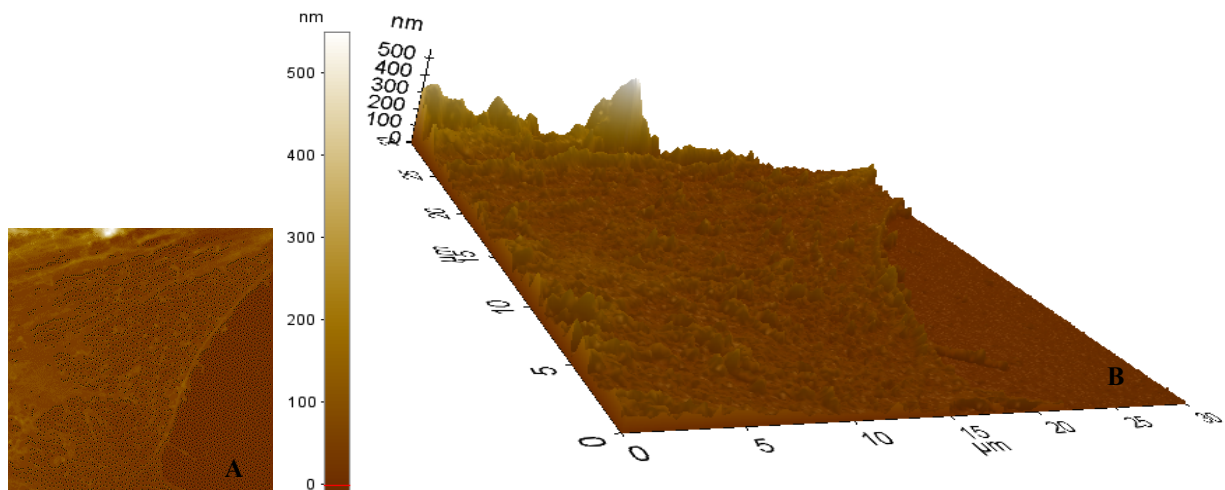


Figura 4.46 A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine tridimensionale. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.47 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.45. La differenza delle ordinate dei *marker* rossi permettono di delimitare le estremità delle regioni selezionate e calcolare così la differenza fra i valori delle ordinate relative ai *marker*. Nel profilo appartenente alla linea rossa (*line profile* 142) la regione di $22.7\ \mu\text{m}$ ha una differenza di altezze all'estremità selezionata di 1.1

nm mentre per la linea verde (*line profile* 127), ortogonale alla precedente, la regione è di 25 μm la differenza è di 7.7 nm.

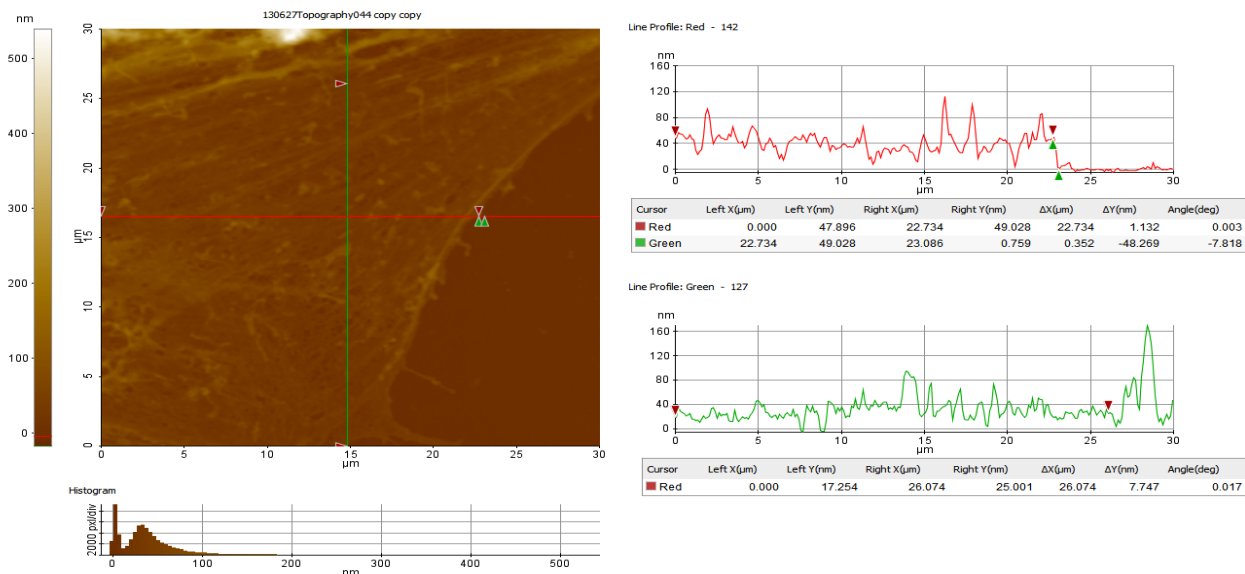


Figura 4.47 In figura sono riportati due *line profile* in cui sono visibili le fibre citoscheletriche ed una regione di connessione con il supporto di crescita. La scansione della regione è di 30 μm x 30 μm . A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . I *marker* rossi delimitano la regione tra il bordo (a destra) e l'estremità sinistra dell'immagine.

In figura 4.48 è riportata l'immagine di una cellula Hs 578Bst, trattata con K:D-rib 5mM per 48h, fissata e colorata con Giemsa.

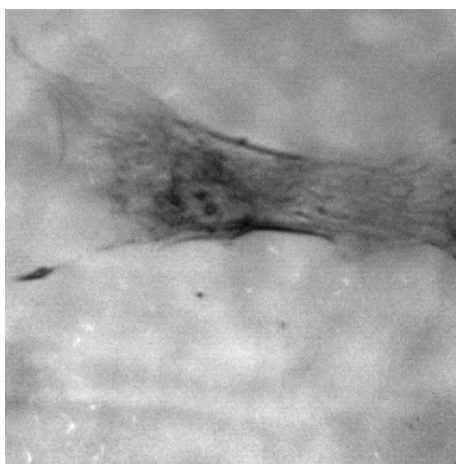


Figura 4.48 Immagine acquisita al microscopio ottico di una cellula Hs 578Bst trattata con K:D-rib 5mM per 48h. Le cellule sono state fissate con PFA al 4% e colorate con Giemsa, per ottimizzare la visualizzazione al microscopio a Forza Atomica.

In figura 4.49 sono riportate le immagini di alcune aree della cellula in figura 4.48, acquisite tramite AFM.

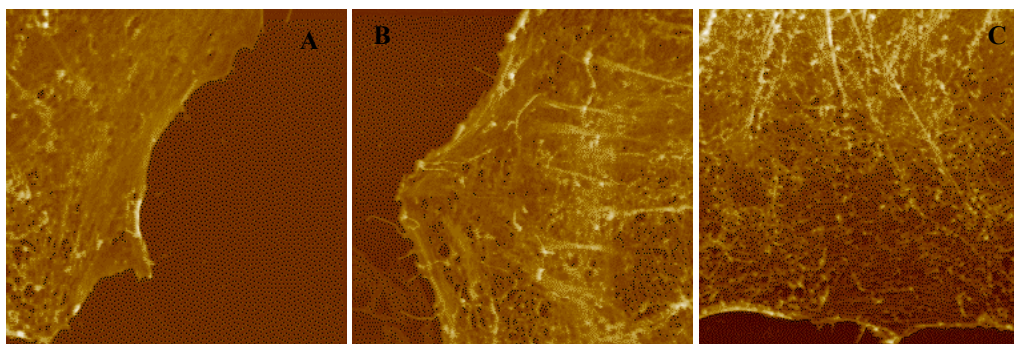


Figura 4.49: Immagini AFM della cellula mostrata in precedenza **A)** Estremità della cellula con visibili le fibre citoscheletriche ed il bordo **B)** Porzione della cellula in cui sono molto evidenti le fibre ed il bordo cellulare, di $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$. **C)** Porzione sottostante il nucleo. Sono molto evidenti le fibre citoscheletriche ed il bordo cellulare.

In Figura 4.50 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.49 B. Si riconosce perfettamente l'organizzazione delle fibre citoscheletriche connesse alla membrana cellulare ed ancora una volta è mostrata una direzionalità e l'ordine tipico del citoscheletro. Il bordo delle cellule è integro e sembra ben connesso al supporto sui cui le cellule sono state fatte crescere.

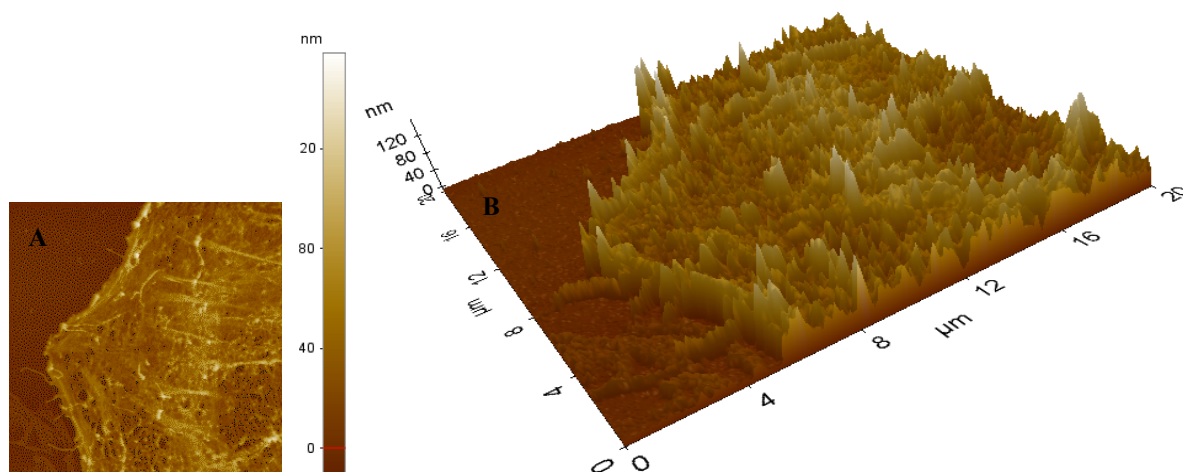


Figura 4.50 **A)** Immagine AFM bidimensionale. **B)** Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.51 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.50. La differenza delle ordinate dei *marker* rossi permettono di delimitare le estremità delle regioni selezionate e calcolare così la differenza fra i valori delle ordinate relative ai *marker*. Nel profilo in rosso (*line profile* 135) la regione di $16.2\ \mu\text{m}$ ha una differenza di altezze all'estremità selezionata di $7.5\ \text{nm}$ mentre per il

profilo in verde (*line profile* 115), ortogonale alla precedente, la regione è di $17.4 \mu\text{m}$ la differenza è di 6 nm , in valore assoluto.

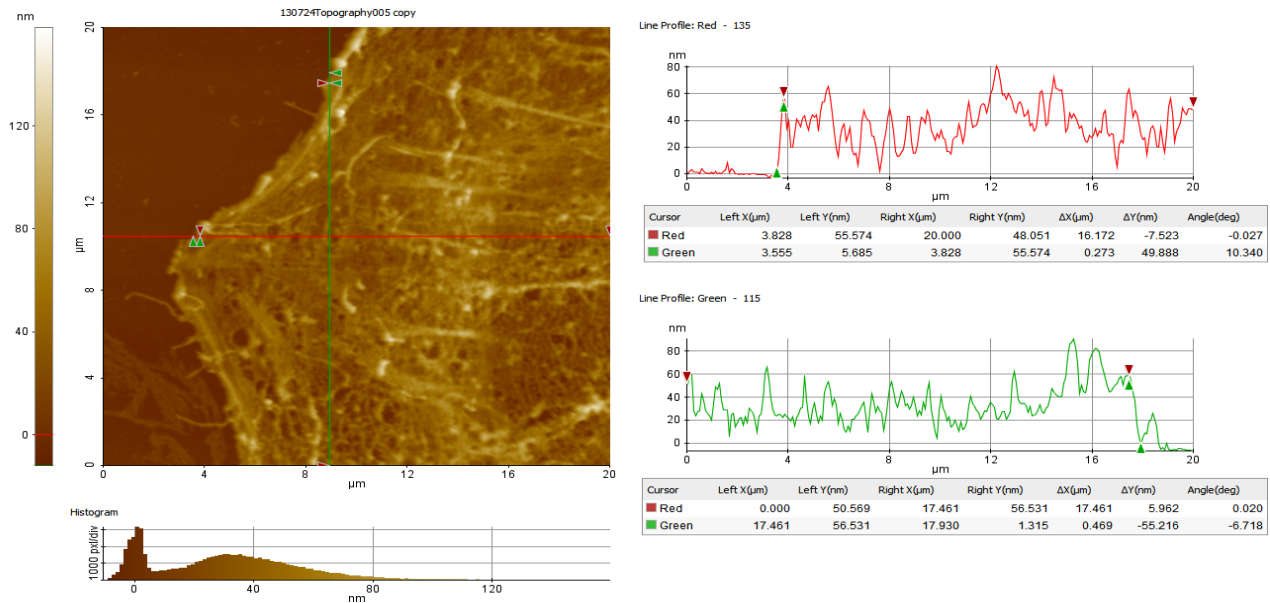


Figura 4.51 In figura sono riportati due *line profile* di una regione di una cellula Hs 578Bst trattata con K:D-rib 5mM , in cui sono riconoscibili le fibre citoscheletriche e la regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm , in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Sotto ad entrambi i grafici, sono riportate le coordinate ed i valori ottenuti dai *marker*.

In Figura 4.52 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.52 A. Si riconosce sempre l'organizzazione delle fibre citoscheletriche connesse alla membrana cellulare e l'ordine tipico del citoscheletro. Il bordo delle cellule è integro e sembra ben connesso al supporto sui cui le cellule sono state fatte crescere.

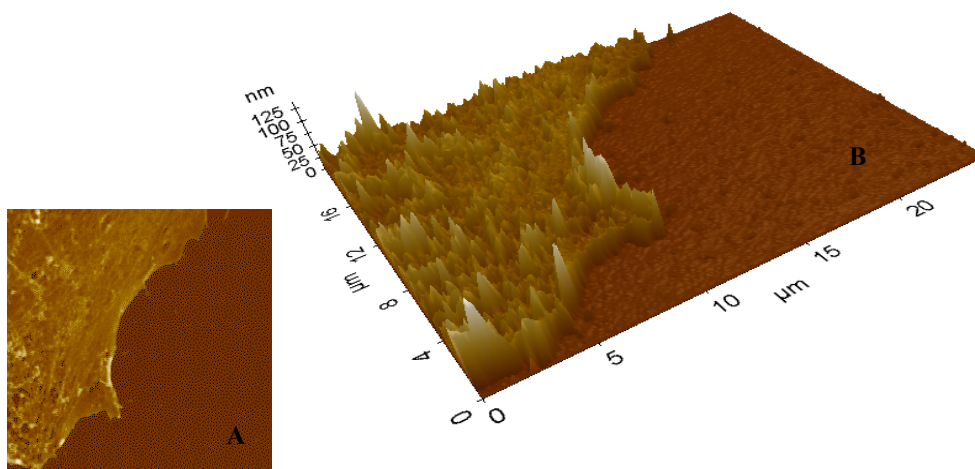


Figura 4.52 A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.53 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.52. I *marker* rossi delimitano la regione tra il bordo della cellula e l'estremità dell'immagine. Nel profilo appartenente al *line profile* rosso la regione selezionata dai *marker* rossi di 13.3 μm ha una differenza di altezze all'estremità selezionata di 19.8 nm mentre per il profilo in verde (*line profile* 108), la regione è di 10.2 μm e la differenza è di 7 nm.

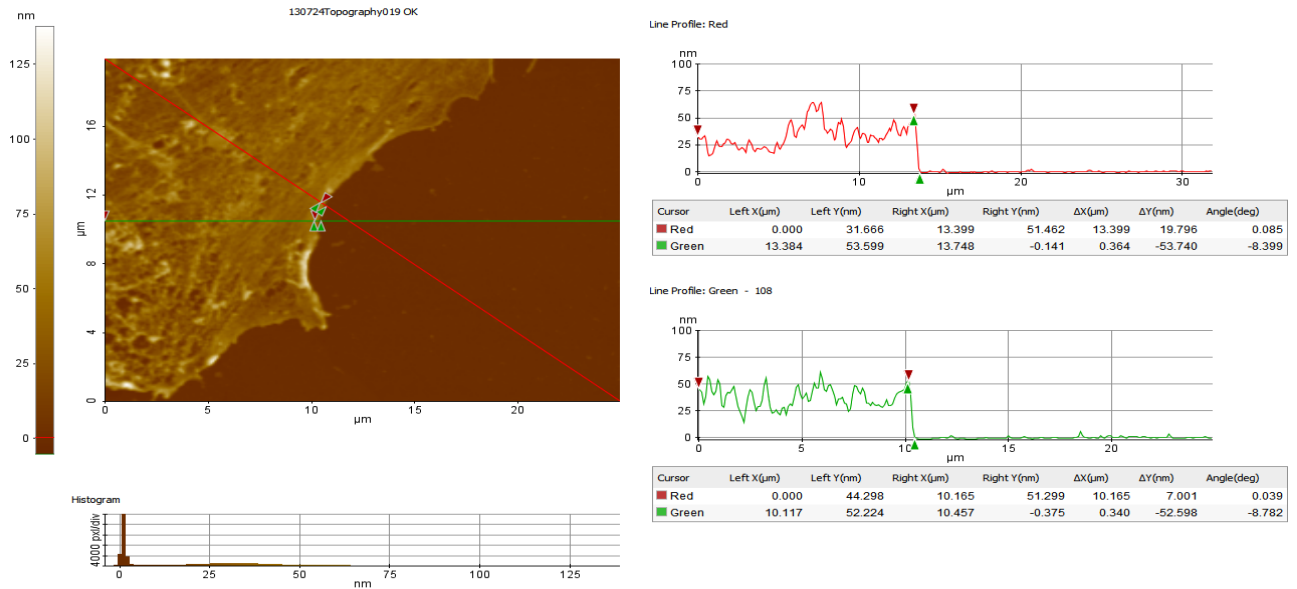


Figura 4.53: In figura sono riportati due *line profile* di una regione di una cellula Hs 578Bst trattata con K:D-rib 5mM. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Sotto ad entrambi i grafici, sono riportate le coordinate ed i valori ottenuti dai *marker*. Sotto l'immagine bidimensionale della cellula si trova un istogramma in cui è riportata la distribuzione dei pixel in base all'intensità del colore, correlata alle altezze delle strutture cellulari incluse.

In Figura 4.54 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.54 A. Si riconosce sempre l'organizzazione delle fibre citoscheletriche connesse alla membrana cellulare e l'ordine tipico del citoscheletro. Il bordo delle cellule è integro e sembra ben connesso al supporto sui cui le cellule sono state fatte crescere.

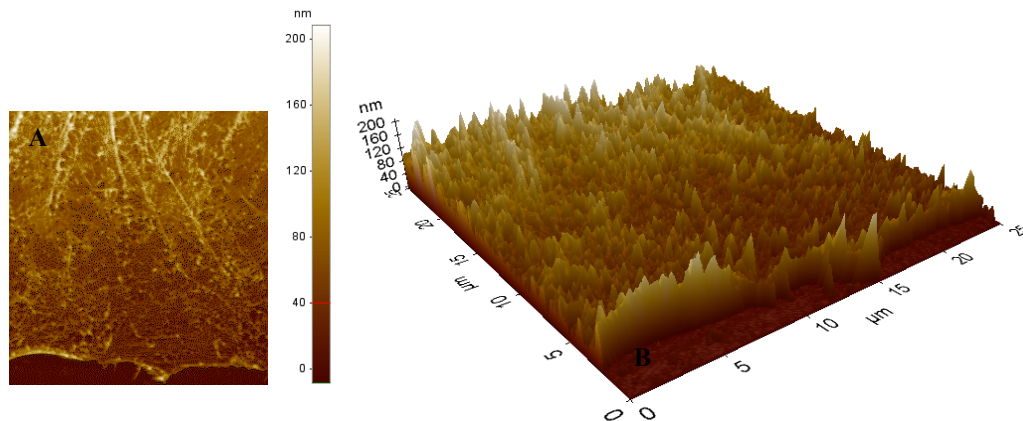


Figura 4.54 A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.55 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.54. I *marker* rossi delimitano le estremità dei profili. Paralleli ed ad una distanza l'uno dall'altro di circa 19 μm . Nel profilo appartenente alla linea rossa la regione selezionata dai *marker* rossi di 25 μm ha una differenza di altezze all'estremità selezionata di 77.5 nm, in valore assoluto. Nel profilo in verde (*line profile* 59), le estremità mostrano una differenza in altezza di 45.8 nm, sempre in valore assoluto.

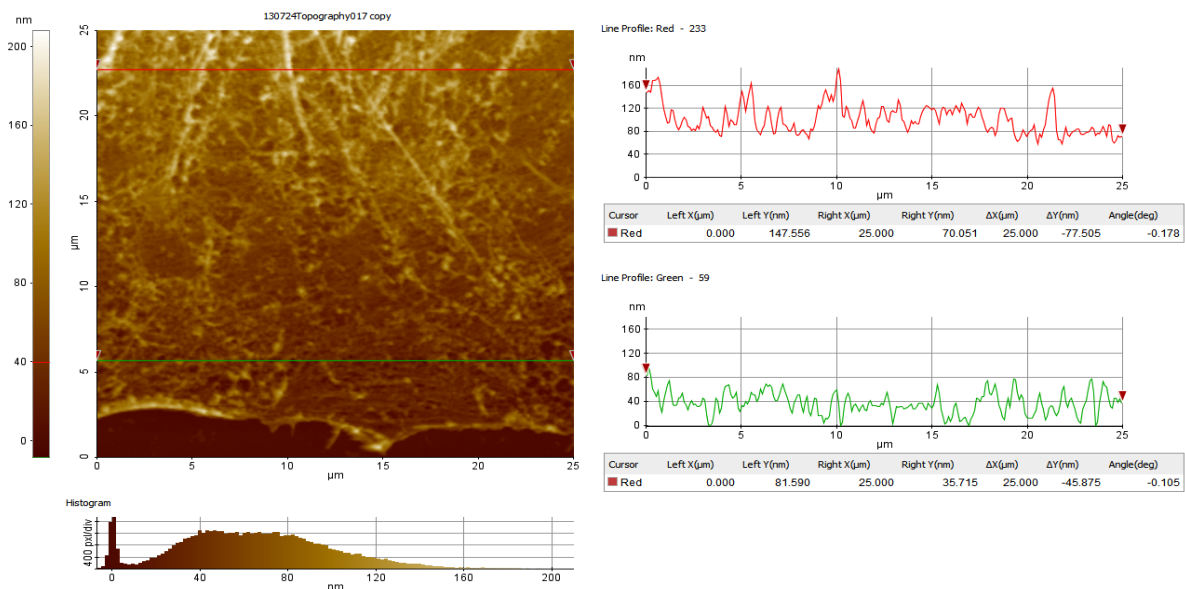


Figura 4.55: In figura sono riportati due *line profile* di una regione di una cellula Hs 578Bst trattata con K:D-rib 5mM in cui sono visibili le fibre citoscheletriche e riconoscibile una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 25 μm x 25 μm . A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Sotto ad entrambi i grafici, sono riportati i valori ottenuti dal posizionamento dei *marker*.

In figura 4.56 vi è l'immagine acquisita tramite microscopio ottico di una cellula irraggiata con una dose da 4 Gy di raggi X, fissata e colorata con Giemsa.

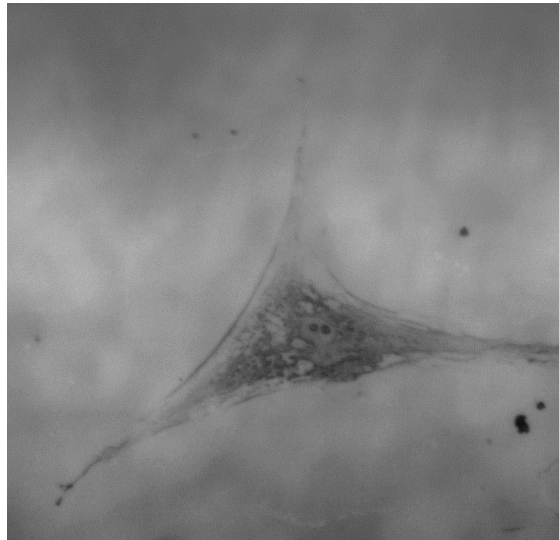


Figura 4.56: Immagine acquisita al microscopio ottico di una cellula Hs 578Bst irraggiata con una dose di 4Gy. Le cellule sono state fissate con PFA al 4% e colorate con Giemsa, per ottimizzare la visualizzazione al microscopio a Forza atomica.

Nella figura 4.57 sono riportate le immagini acquisite tramite AFM di regioni della cellula prossime al nucleo, in cui si ritengono esser distretti interessanti per visualizzare il danno da radiazioni ionizzanti.

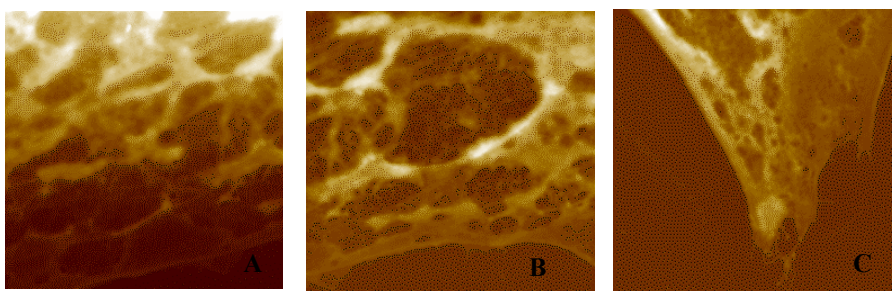


Figura 4.57: Immagini AFM di aree appartenenti alla cellula in figura 4.56, nella zona fra nucleo e bordo cellulare. Sono evidenti i danni da irraggiamento (4Gy). La scansione delle immagini A e B è di 20 µm x 20 µm ed entrambe le aree sono vicine al nucleo. L'area riportata nella figura C è di 25 µm x 25 µm e mostra la connessione della cellula al substrato: un'area distante dal nucleo.

In Figura 4.58 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.58A. Sono presenti danni al citoscheletro ed anche compromissione della struttura della membrana cellulare. Sono

visualizzabili delle vere e proprie “cavità”. In figura 4.58 B la visualizzazione da un’idea della tridimensionalità del danno da radiazioni; dose da 4 Gy.

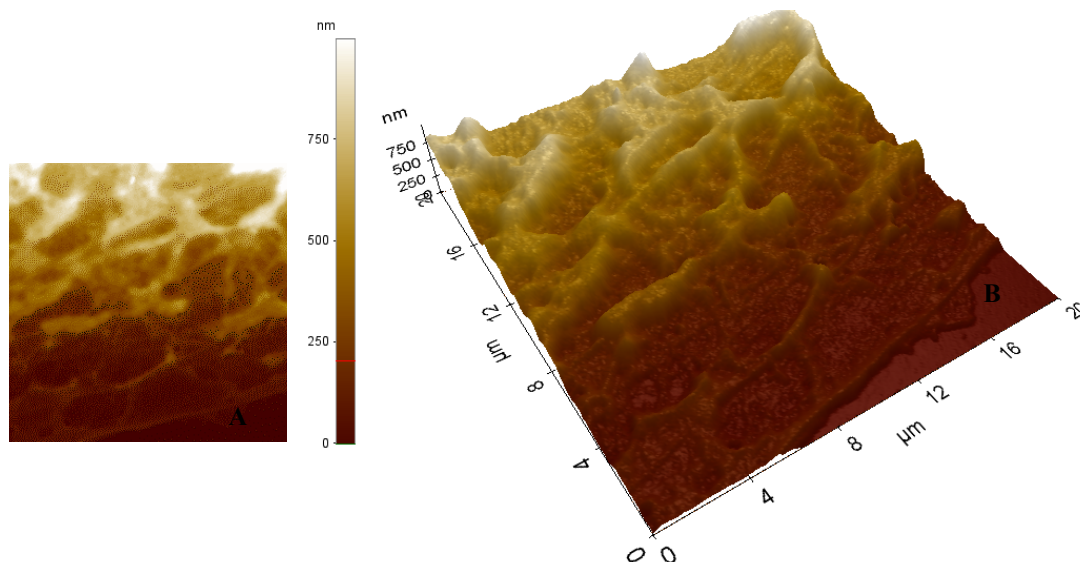


Figura 4.58: **A)** Immagine AFM bidimensionale. **B)** Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l’area della scansione e nell’angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.59 sono riportati i *line profile* dell’immagine 4.58 . Il profilo in verde (*line profile 231*) e il profilo in rosso (*line profile 140*) mostrano la topografia delle regioni danneggiate. Sono riconoscibili cavità, coerenti con danni alla membrana e nella parte sottostante sembrano visibili anche porzioni di fibre citoscheletriche.

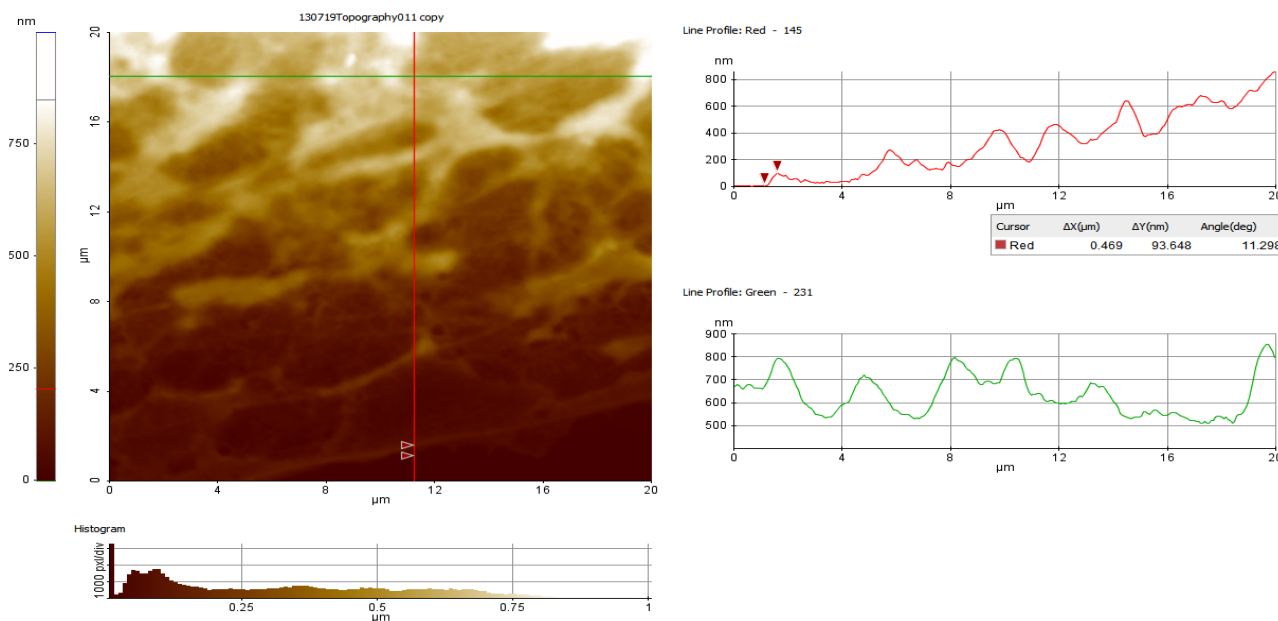


Figura 4.59 In figura sono riportati due *line profile*. È riconoscibile una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. A destra dell’immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono

espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in mm. Sotto al *line profile* si trovano i valori dei parametri associati ai marker.

In Figura 4.60 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.60 A. Sono presenti danni al citoscheletro e sembra anche un'evidente compromissione della struttura della membrana cellulare. Sono visualizzabili strutture simili a "cavità". In figura la visualizzazione tridimensionale da una maggior informazione visiva relativa al danno da radiazioni; dose da 4 Gy

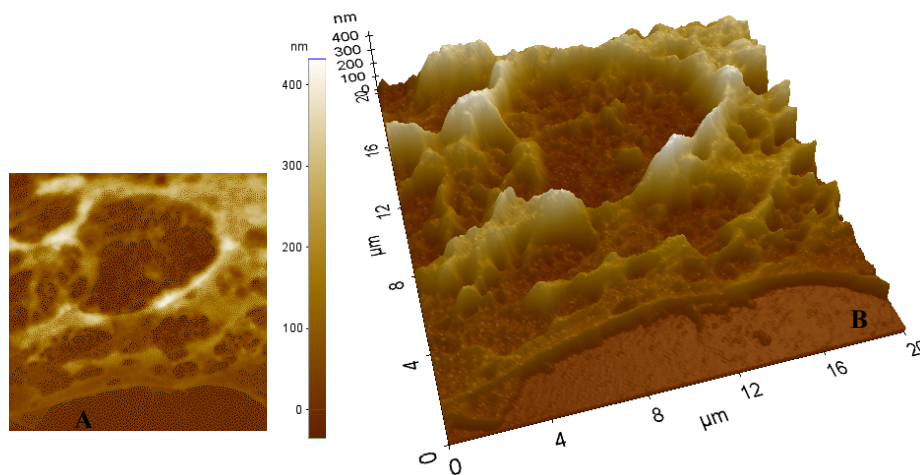


Figura 4.60 A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.61 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.60. Il profilo in verde (*line profile* 185) e il profilo in rosso (*line profile* 122) ortogonali mostrano la topografia delle regioni danneggiate e le dimensioni della cavità centrale. Entrambi i profili mostrano nella regione sottostante una certa irregolarità. La cavità misura $13.3 \mu\text{m} \times 9.7 \mu\text{m}$.

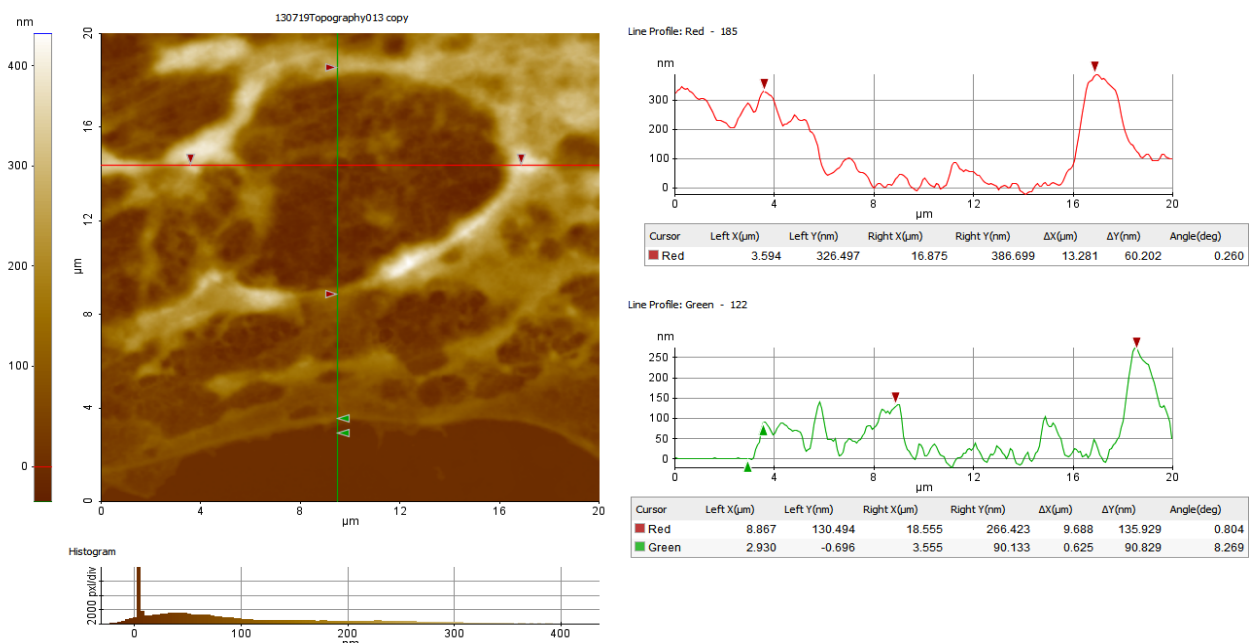


Figura 4.61: In figura sono riportati due *line profile* dell' area di una cellula Hs 578Bst irradiata con una dose di 4Gy. È riconoscibile una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 20 μm x 20 μm . A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse *y*) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse *x*) i cui valori sono espressi in μm .

In Figura 4.61 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.62 A. Il distretto qui riportato mostra danni al citoscheletro, ma il danno alla membrana ha un aspetto diverso rispetto alle altre immagini. Sono presenti lesioni citoscheletriche e compromissione della struttura della membrana.

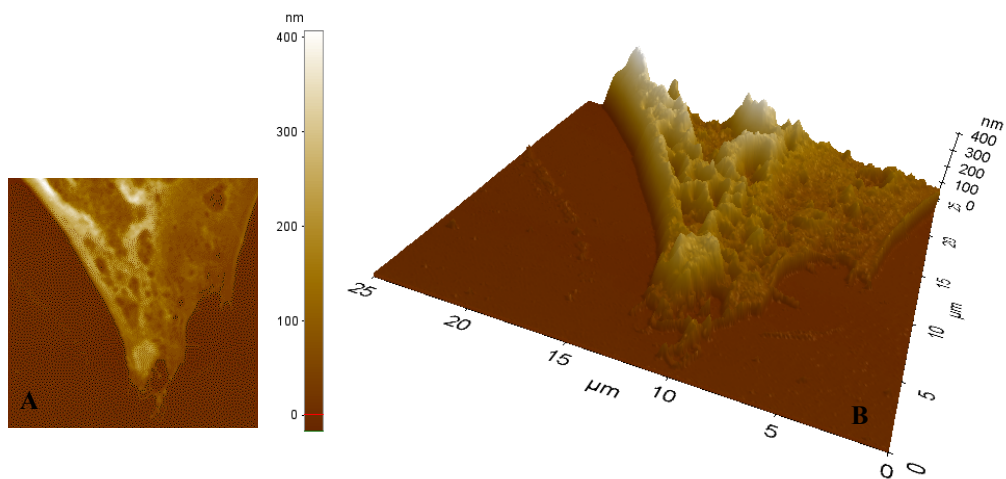


Figura 4.62: **A)** Immagine AFM bidimensionale. **B)** Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle altezze

In figura 4.63 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.62 . Il profilo in verde (*line profile 126*) mostra la topografia nella zona di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Sono evidenti forti irregolarità e cavità, compatibili con un danno alla membrana. Il profilo rosso mostra la topografia della regione danneggiata di dimensioni pari a 11.4 μm e la dimensioni della cavità centrale. Il bordo della cellula sembra integro, ma si trova dalla parte opposta alla regione danneggiata ed ha un'altezza di 82.7 nm.

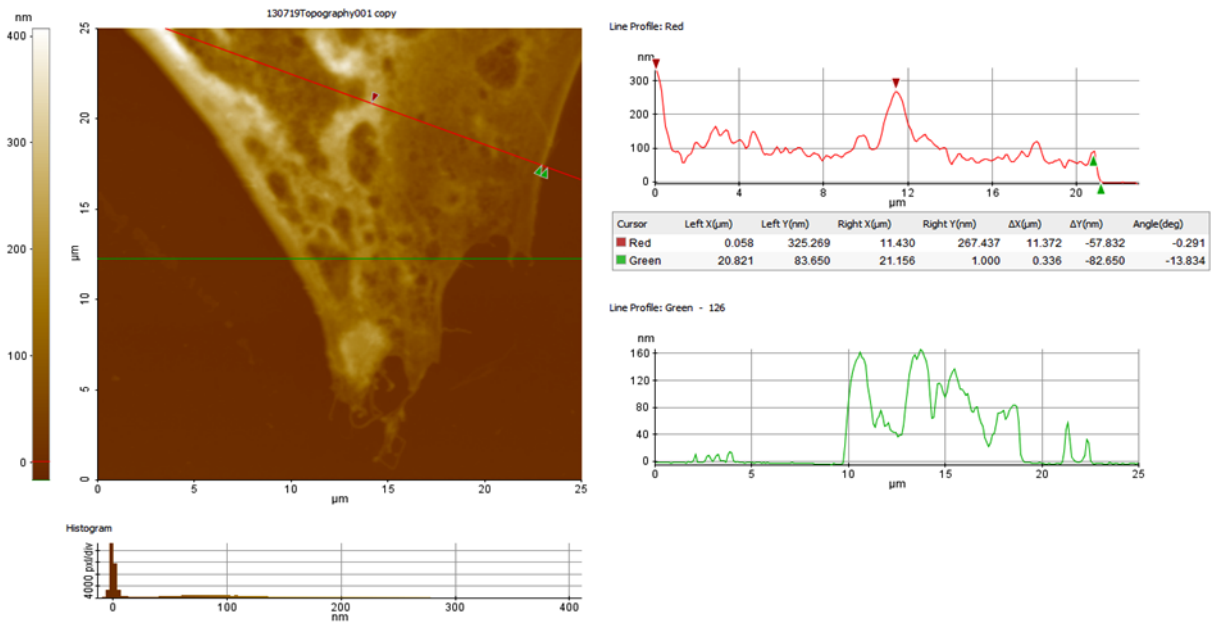


Figura 4.63: In figura sono riportati due *line profile* dell' area di una cellula Hs 578Bst irraggiata con una dose di 4Gy. È Sono evidenti i danni alla membrana e alle fibre citoscheletriche. È riconoscibile una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 25 μm x 25 μm. A destra dell'immagine della cellula sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm. Sotto ad entrambi i grafici, sono riportate le coordinate ed i dati ottenuti dai *marker*.

In figura 4.64 è riportata l'immagine acquisita tramite microscopio ottico di una cellula pretrattata con K:D-rib 5mM ed irraggiata con una dose da 4 Gy di raggi X, fissata e colorata con Giemsa.

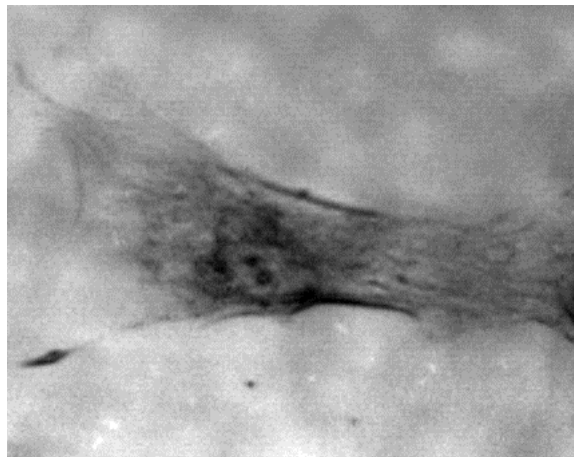


Figura 4.64 Immagine acquisita al microscopio ottico di una cellula Hs 578Bst trattata per 48h ed irraggiata con raggi X- dose 4Gy . Le cellule sono state fissate con PFA al 4% e colorate con Giemsa, per ottimizzare la visualizzazione al microscopio a Forza atomica.

In figura 4.65 sono riportate le immagini di alcune aree della cellula in figura 4.64, acquisite tramite AFM. Le aree sono simili a quelle mostrate per le regioni irraggiate e trattate.

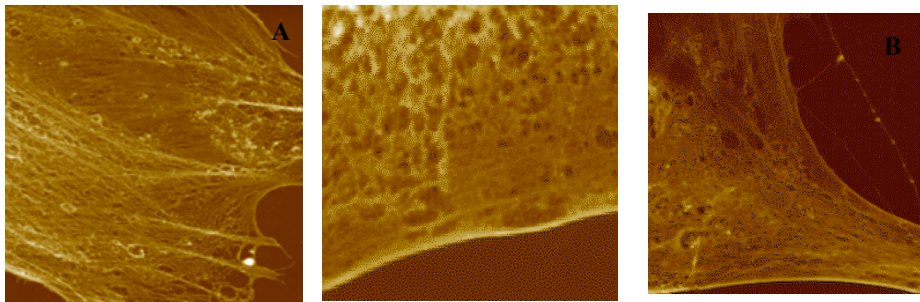


Figura 4.65 Immagini AFM della cellula mostrata in figura 4.27. Tutte e tre le scansioni sono di $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$. **A)** Estremità della cellula con visibili le fibre citoscheletriche e le connessioni al substrato **B)** Porzione della cellula in cui è visibile il bordo. **C)** Porzione sottostante il nucleo. Sono molto evidenti le fibre citoscheletriche ed il bordo cellulare.

In Figura 4.66 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.66 A. Sono evidenti le strutture citoscheletriche ed è ristabilito un certo ordine strutturale. La struttura presente nell'area $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ è un'impurità.

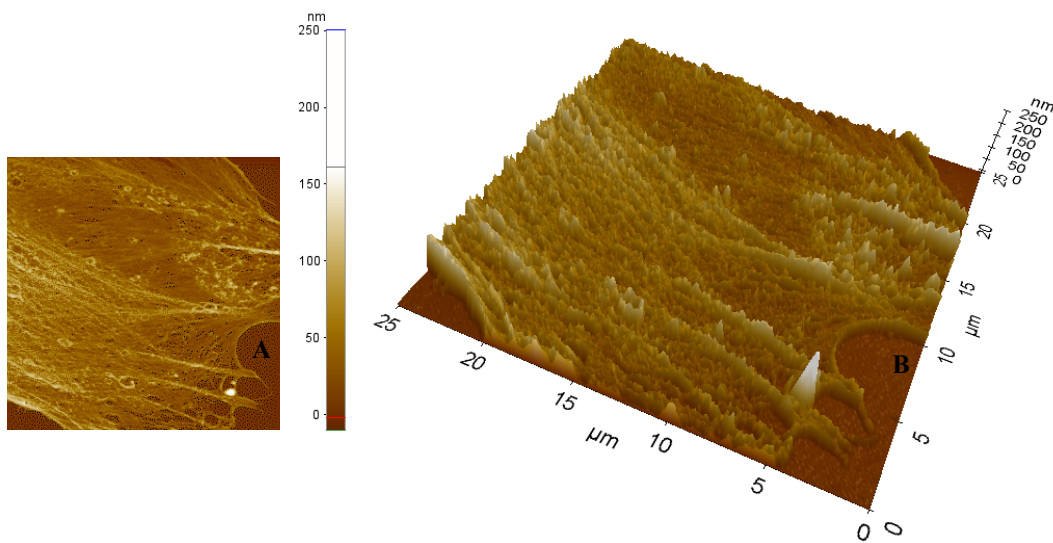


Figura 4.66 **A)** Immagine AFM bidimensionale. **B)** Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze.

In figura 4.67 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.66. La differenza delle ordinate dei *marker* rossi permettono di delimitare le estremità delle regioni selezionate e calcolare così la differenza fra i valori delle ordinate relative ai *marker*. Nel profilo in rosso (*line profile* 193) la distanza tra i *marker* è di regione di $24.5\ \mu\text{m}$ e la differenza in altezza è di $9.8\ \text{nm}$ mentre per il

profilo in verde (*line profile 58*) la scansione è di 25 μm la differenza delle altezze è di 5.6 nm in valore assoluto.

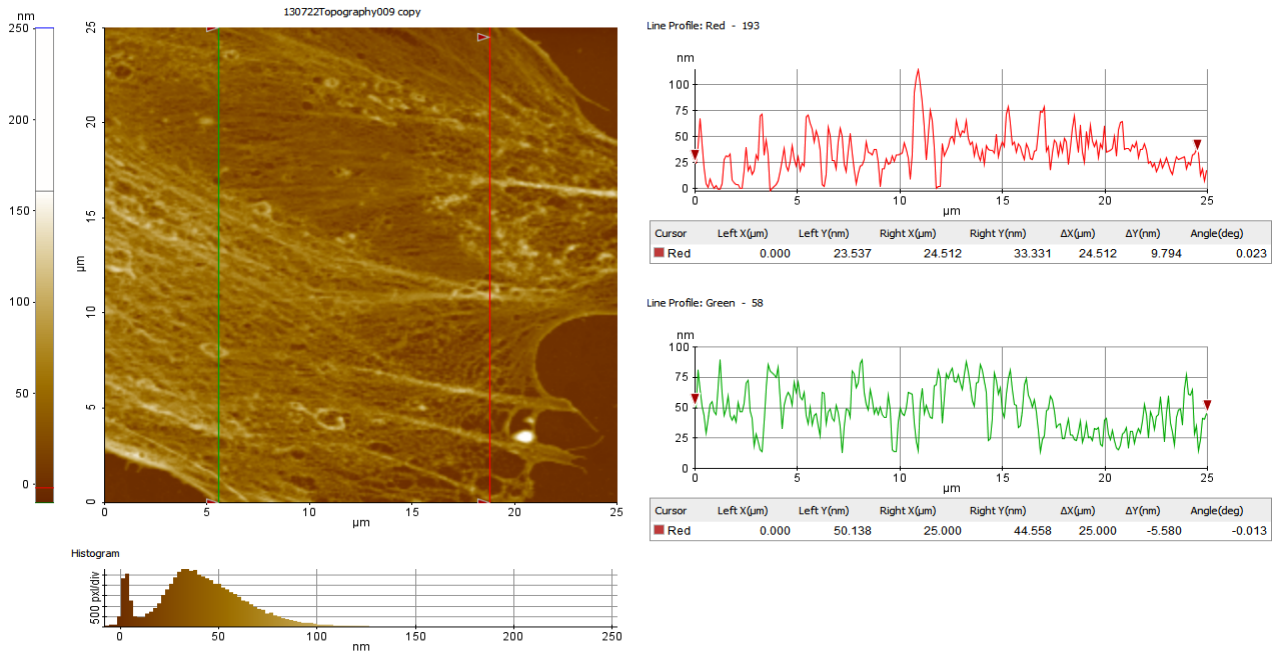


Figura 4.67: In figura sono riportati due *line profile* dell'area di una cella trattata con K:D-rib 5mM ed irradiata con dose di 4Gy. È riconoscibile una regione di connessione fra la cella ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 25 μm x 25 μm . A destra dell'immagine sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Sotto ad entrambi i grafici sono riportati i valori ottenuti dai *marker*.

In Figura 4.68 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.68 A. Non sono evidenti le strutture citoscheletriche nella regione sottostante la membrana, anche se sembra "ristabilito" un certo ordine. La membrana non appare particolarmente danneggiata. È ben evidente anche la struttura del bordo cellulare.

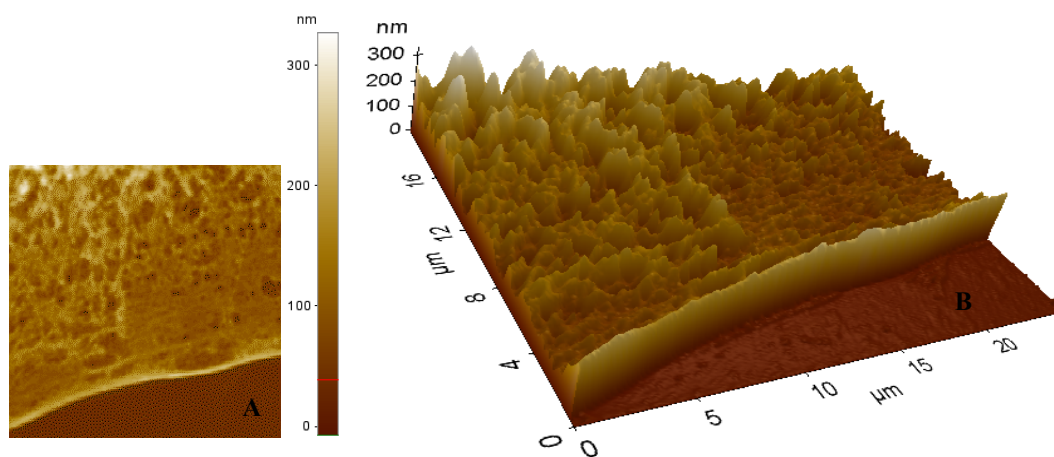


Figura 4.68 A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a destra è riportata la barra delle altezze

In figura 4.69 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.68. La differenza delle ordinate dei *marker* rossi delimitano le estremità delle regioni incluse nei profili longitudinali. Nel profilo in rosso (*line profile 185*) la scansione è di 25 μm e la differenza in altezza è di 21 nm e per il profilo in verde (*line profile 104*) la scansione è 24.8 μm e la differenza è di 38 nm in valore assoluto, coerente con un parziale riarrangiamento strutturale.

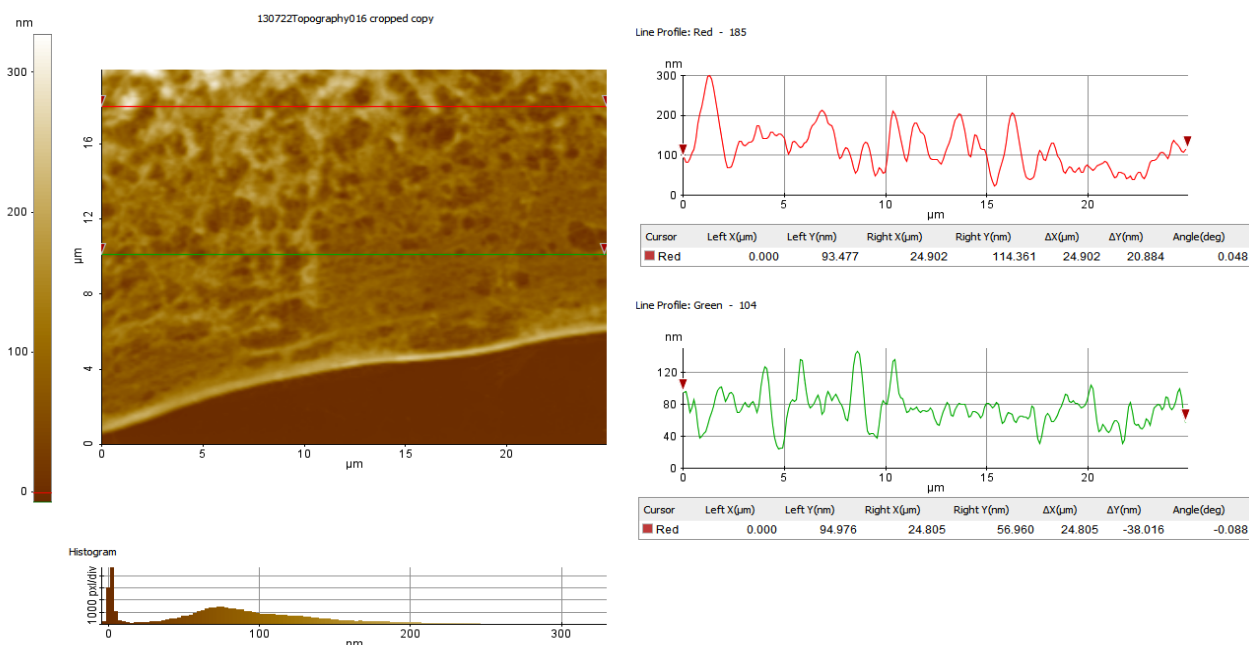


Figura 4.69 In figura sono riportati due *line profile* dell'area di una cellula trattata con K:D-rib 5mM ed irraggiata con dose di 4Gy. È riconoscibile una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 25 μm x 20 μm . A destra dell'immagine sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in μm . Sotto ad entrambi i grafici sono riportati i valori ottenuti dai *marker*.

In Figura 4.70 B è mostrata la visualizzazione tridimensionale dell'immagine 4.70 A. Sono visibili le strutture citoscheletriche nella regione sottostante la membrana ed ancora una volta è ristabilito un certo ordine strutturale. La membrana non sembra particolarmente danneggiata ed è ben evidente anche la struttura del bordo cellulare.

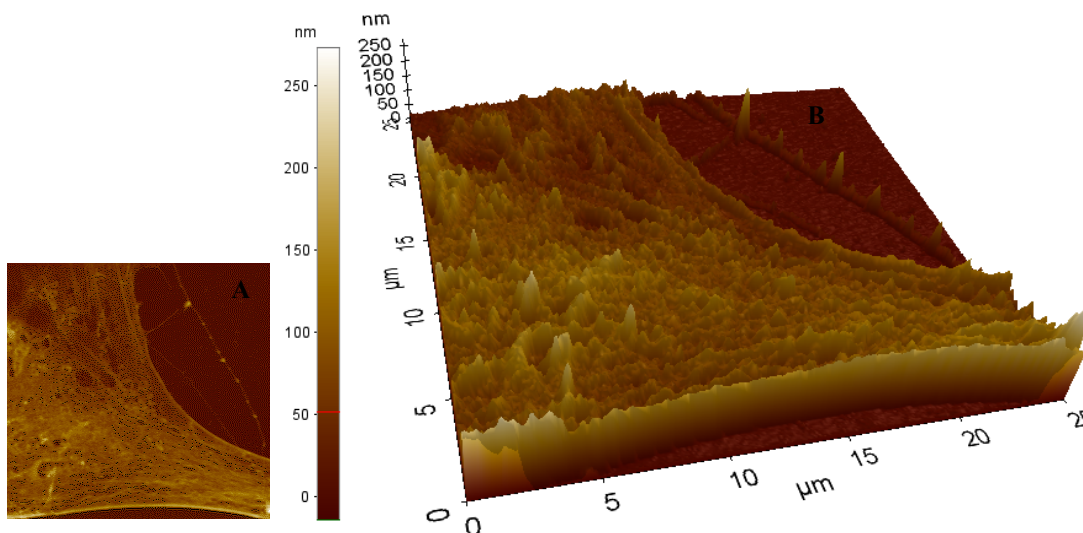


Figura 4.70: A) Immagine AFM bidimensionale. B) Visualizzazione della stessa immagine in 3D. È riportata l'area della scansione e nell'angolo superiore a sinistra è riportata la barra delle

In figura 4.71 sono riportati i *line profile* dell'immagine 4.70. La differenza delle ordinate dei *marker* rossi delimitano le estremità delle regioni incluse nei profili longitudinali. Il profilo rosso (*line profile* 201) mostra una regione è piuttosto irregolare. Nonostante questo la differenza è di 8,1 nm mentre per il profilo in verde (*line profile* 100) la scansione è 23.8 μm e la differenza in altezza 82.6 nm in valore assoluto. L'altezza maggiore è coerente con il bordo cellulare molto più alto, tipico di quest'area.

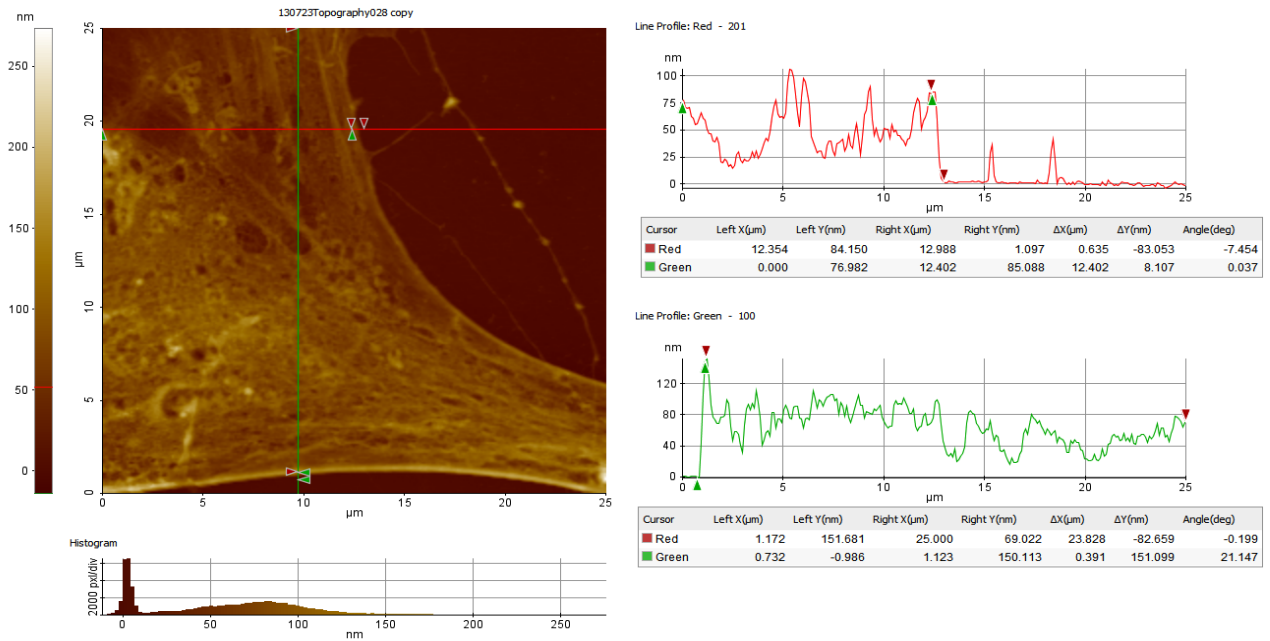


Figura 4.71: In figura sono riportati due *line profile* dell'area di una cellula trattata con K:D-rib 5mM ed irraggiata con dose di 4Gy. È riconoscibile una regione di connessione fra la cellula ed il supporto di crescita. Le dimensioni della regione sono 25 µm x 25 µm. A destra dell'immagine sono riportati i profili topografici delle due linee selezionate visualizzabili come grafici di altezze (asse y) i cui valori sono espressi in nm, in funzione di lunghezze (asse x) i cui valori sono espressi in µm. Sotto ad entrambi i grafici sono riportati i valori ottenuti dai *marker*

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

5.1 SPETTROSCOPIA UV/VIS E K:D-rib

Un aspetto chiave dell'effetto del K:D.rib, ovvero soluzione acquosa di D-ribosio e KHCO_3 , potrebbe essere legato alla sua struttura. Al fine di iniziare la caratterizzazione chimica e strutturale del K:D-rib si sono condotti esperimenti di spettroscopia UV/VIS sia sulla soluzione acquosa che sui singoli componenti D-ribosio e KHCO_3 alla concentrazione di 500 mM. Una variabile da noi presa in considerazione sono le condizioni in cui questa reazione avviene. Si sono acquisiti gli spettri sia a temperatura ambiente che ad una temperatura di 37°C . Gli spettri dei campioni acquisiti dopo 4h d'incubazione sono stati confrontati con quelli acquisiti immediatamente dopo la preparazione. La scelta dell'acquisire spettri UV/VIS sia a temperatura ambiente che a 37°C , deriva dal fatto che durante il trattamento cellulare il K:D-rib rimane a contatto con le cellule in incubatore.

Dagli spettri riportati in figura 4.1 è evidente come le condizioni di crescita cellulare non influenzino l'assorbimento del KHCO_3 e che le differenze nell'assorbimento del D-ribosio dopo un'incubazione di 4h rispetto all'assorbimento del D-ribosio a temperatura ambiente siano trascurabili, infatti gli spettri sono sovrapponibili. È evidente inoltre che le condizioni di crescita non modificano in modo rilevante l'attività ottica del D-ribosio in nessuna regione dello spettro d'assorbimento, almeno entro le quattro ore.

Mentre, come riportato in figura 4.1, gli spettri d'assorbimento del K:D-rib a temperatura ambiente (spettro verde) e dopo un'incubazione di 4h (spettro rosso) sono significativamente diversi. Il picco di assorbimento del K:D-rib incubato a 37°C è spostato verso il rosso rispetto al K:D-rib a temperatura ambiente oltre a mostrare un'assorbanza significativamente maggiore. Dal fit posso essere attribuiti due picchi uno a 274 nm e l'altro a 303 nm, caratteristici di transizioni $n \rightarrow \pi^*$, queste componenti sono presenti in rapporti diversi nei due campioni, quello a temperatura ambiente rispetto a quello incubato a 37° . In particolare la componente a 303 nm "pesa" maggiormente rispetto alla componente a 274 nm spostando il picco risultante verso il rosso. Come prima cosa si può concludere che il K:D-rib presenta due componenti nella regione 270-300 e che la componente a 274 nm è quasi il doppio della componente a 278 nm del D-ribosio. L'aumento di questa componente si può attribuire all'apertura dell'anello emiacetalico del D-ribosio stabilizzando così la struttura aperta dello zucchero ed il gruppo aldeidico o $-\text{CH}=\text{O}$ e a 37°C questa componente aumenta circa del doppio.

Quindi la temperatura e la presenza del KHCO_3 un sale a pH basico, potrebbe creare una maggior concentrazione di struttura aperta, maggiormente reattiva, che generalmente è al di sotto del 1% nel D-ribosio.

Sull'altra componente quella a 303 nm non si hanno ancora elementi sufficienti per l'attribuzione. La ricerca si orienterà su misure IR e NMR che potrebbero risolverne l'attribuzione.

5.2 UV/VIS - INTERAZIONE TRA MTT E K:D-rib

Il bromuro di tetrazolio è il sale utilizzato per il saggio metabolico MTT. Il saggio viene utilizzato per testare la vitalità cellulare assumendo che cellule metabolicamente attive, possano ridurre il bromuro di tetrazolio a *formazan*, composto apolare e tossico per la cellula. Inizialmente si pensava che quest'attività fosse peculiare delle reduttasi mitocondriali e che avvenisse solo nei mitocondri, ma studi approfonditi hanno dimostrato che nella riduzione del bromuro di tetrazolio a *formazan* intervengono anche altri compartimenti cellulari ed altre reduttasi, non solo quelle mitocondriali.

Gli esperimenti di spettroscopia UV/VIS dimostrano l'interazione fra il K:D-rib e bromuro di tetrazolio, già vista con cellule carcinoma canino A72 trattate con K:D-rib a diverse concentrazioni. In quell'esperimento le cellule trattate con concentrazioni K:D-rib pari a 150 mM e 75 mM sembrava fossero perfettamente vitali ed attive metabolicamente, in quanto vi era un'altissima produzione di *formazan*. Da una successiva analisi al microscopio ottico tali cellule erano morte. Il K:D-rib espleta la funzione reduttasica, comportandosi come un riducente o antiossidante, riducendo il bromuro di tetrazolio a *formazan* (Crocchi *et al.*, 2011)

. In figura 4.2 A sono riportati gli spettri di assorbimento UV/VIS del *formazan* ottenuto da diverse concentrazioni di K:D-rib incubato con bromuro di tetrazolio, in accordo con il protocollo del saggio MTT (ROCHE). L'unica differenza tra il saggio MTT della ROCHE ed il nostro è che le cellule, di cui si dovrebbe presumibilmente saggiare la vitalità e/o attività metabolica, non ci sono. Confrontando lo spettro di assorbimento del *formazan* derivante dall'attività metabolica cellulare, presente nel *data sheet* fornito dalla Roche (Figura 4.2 B), con gli spettri del *formazan* ottenuti dalle diverse concentrazioni di K:D-rib, non si notano differenze.

Inoltre la produzione di *formazan*, è proporzionale alla concentrazione di K:D-rib utilizzata. Come si può notare dalla figura 4.2 A il K:D-rib interagisce con il bromuro di tetrazolio già alla concentrazione di 5mM riducendolo a *formazan*.

Inoltre in un lavoro del 2000 viene mostrata la capacità che l'acido ascorbico ha di ridurre il sale del MTT a *formazan* in assenza di organismi viventi. In questo lavoro la produzione di *formazan* è ulteriormente incrementata dalla presenza del retinolo quale catalizzatore della reazione

di elettroni dalla vitamina C al bromuro di tetrazolio, il quale chimicamente rimane invariato (Chakrabarti et al., 2000). Quindi il K:D-rib riducendo il bromuro di tetrazolio a *formazan* così come l'acido ascorbico ci porta ad attribuire al K:D-rib un inequivocabile carattere antiossidante.

5.3 PROLIFERAZIONE Hs 578T

L'interazione fra il K:D-rib ed il bromuro di tetrazolio hanno impedito l'utilizzo dei saggi metabolici convenzionali. Non avendo letteratura circa il K:D-rib e non sapendo l'effetto a lungo termine sul modello di studio scelto, si è deciso di trattare la linea cellulare Hs 578T per 50 giorni con K:D-rib ad una concentrazione di 5mM. Per saggiare la proliferazione cellulare si è utilizzato il numero di *split* ossia il numero di volte in cui la popolazione cellulare è arrivata a confluenza, è staccata ed immediatamente riseminata ad una concentrazione inferiore. La diluizione scelta per lo *split* è 1:2. Questa è una metodologia ampiamente utilizzata nei laboratori in cui si utilizzano le culture cellulari. È una tecnica tanto semplice quanto informativa circa l'andamento di crescita generale di una popolazione cellulare. La durata del trattamento estremamente lunga è dettata dal voler ottenere informazioni circa i potenziali fenomeni di adattamento che le cellule tumorali possono esibire durante un trattamento farmacologico. Com'è riportato in figura 4.3 sono riconoscibili due andamenti distinti fra controllo e trattato. La pendenza del controllo è costante ed indica che le cellule hanno un'attività proliferativa costante. Le cellule Hs 578T trattate con K:D-rib alla concentrazione di 5mM mostrano un rallentamento della proliferazione

Nell'arco dei 50 giorni di trattamento le cellule di controllo sono state *splittate* mediamente ogni 3 giorni, mentre le cellule trattate con K:D-rib 5mM sono state *splittate* mediamente ogni 5 giorni. Il rivela l'andamento non costante della velocità di replicazione della popolazione trattata: se la popolazione delle cellule ha una velocità di replicazione diversa al primo giorno rispetto al 50° giorno di trattamento i dati non possono essere interpolati da una sola retta, come evidenziato dal minor valore di R^2 relativo alla retta d'interpolazione del numero di split dei trattati rispetto ai controlli. Questi dati dimostrano l'efficacia del K:D-rib nel rallentare la proliferazione delle cellule Hs 578T senza evidenziare alcun meccanismo adattativo al trattamento.

5.4 CALCOLO DEL TEMPO DI DUPLICAZIONE Hs 578T

Lo studio della dinamica in popolazioni di cellule tumorali è molto importante per la comprensione della crescita del cancro e varia tra le diverse linee cellulari. Per tale studio è necessario il tempo di duplicazione (DP o Td). Lo studio del tempo di duplicazione cellulare prevede il conteggio della

popolazione cellulare a tempi diversi in modo tale da costruire una curva di crescita (Daukste et al., 2012). In questo lavoro di tesi si è misurato il tempo di duplicazione cellulare. In accordo con il dato relativo al rallentamento della proliferazione cellulare ottenuto con il n° di *split* si è deciso di studiare nel dettaglio che cosa accadeva, alla linea cellulare Hs 578T, entro i primi quattordici giorni di trattamento con K:D-rib 5 mM.

Per fare questo si sono confrontati due metodi per il conteggio cellulare. Il primo prevede un conteggio totale delle cellule dopo 96 h seminate in un pozzetto multi piastra da 4. Questo è un tempo ragionevolmente lungo da permettere alle cellule di compiere almeno un ciclo cellulare (metodo 1). Il secondo metodo prevede il conteggio, ogni 48h per 12 giorni, delle cellule che si trovano lungo le perpendicolari alla petri da 35 mm di diametro. Con i dati derivanti da entrambi i metodi si sono calcolati i tempi di duplicazione, in accordo con l'equazione riportata nel paragrafo 4.3.2. Con il primo metodo otteniamo un tempo di duplicazione $d = 40 \pm 5$ h ed un numero di cellule iniziali $N_0 = 11036 \pm 153$. N_0 è in accordo con il numero di cellule seminate, circa 10000. Mentre con il secondo metodo abbiamo calcolato un tempo di duplicazione $d = 44 \pm 1$ h, che come valore è in accordo con il metodo 1. Avendo dimostrato la coerenza dei due metodi, sono stati calcolati gli effetti del K:D-rib alla concentrazione di 5mM sul DP della linea cellulare Hs 578T utilizzando il secondo metodo. Dai dati emerge che entro le 96 ore il controllo ed il trattato hanno lo stesso andamento cioè entro quattro giorni non si ha nessun rallentamento, mentre dopo le 96h il numero di cellule del trattato inizia a diminuire mentre l'andamento del controllo rimane costante. Il dato del tempo di duplicazione relativo al controllo pari a $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ e per il trattato di $59 \text{ h} \pm 2$ conferma l'effetto anti proliferativo del K:D-rib visto con il numero di split. Anche in questo esperimento la linea cellulare Hs 578T trattata con K:D-rib 5mM non mostra meccanismi di adattamento al trattamento nemmeno durante la fase iniziale del trattamento.

5.5 CLONOGENIC ASSAY Hs 578T

Il saggio di formazione delle colonie o *clonogenic assay* è un test *in vitro* sulla sopravvivenza cellulare basato sulla capacità di una singola cellula di crescere e generare una colonia. La colonia è definita come un gruppo di cellule di almeno 50 unità. Il saggio verifica essenzialmente come ogni cellula nella popolazione mantiene la sua capacità di subire divisioni "illimitate" generando cloni. Il saggio di formazione delle colonie può essere usato per determinare l'efficacia di agenti citotossici, in quanto solo una frazione di cellule seminate potrebbe conservare la capacità di produrre colonie (Franken et al., 2006). La capacità di formare colonie è un aspetto legato alla proliferazione cellulare tumorale. Le potenzialità del saggio clonogenico sono state sfruttate per studiare l'effetto

del K:D-rib sulla capacità che la linea cellulare di carcinoma mammario Hs 578T possiede nel generare colonie. In accordo con il protocollo di *Franken at al.*, si sono testate più concentrazioni di K:D-rib rispetto alle ovvero 5mM, 10 mM e 15 mM in quanto è importante trovare se esiste una la concentrazione di K:D-rib che permetta di delineare il passaggio da rallentamento a blocco della proliferazione cellulare. Dai risultati si vede che le cellule di controllo formano 9 colonie e di tutti i tre trattamenti solo con quello a 5mM formano una colonia dimostrando che il K:D-rib a concentrazioni maggiori di 5mM porta al blocco della capacità clonogenica.

Inoltre se confrontiamo l'immagine della colonia n°2 del controllo in figura 4.6 D con l'immagine della sola colonia del trattato in figura 4.6 E si possono notare due differenze fondamentali che sono il numero di cellule e la dimensione.

Un aumento di dimensione potrebbe voler dire una maggior adesione delle cellule al fondo della petri, da cui potrebbe derivare un apparente aumento delle dimensioni; oppure durante il trattamento con K:D-rib sono subentrati meccanismi tali per cui le cellule hanno modificato le loro dimensioni aumentandole.

5.6 SAGGIO DI CHEMOINVASIONE Hs 578T

Il processo multistep d'invasione tumorale e conseguente metastatizzazione è stato schematizzato come una sequenza di passaggi discreti e ben definiti, talvolta chiamati anche invasione-metastasi a cascata. Questa rappresentazione prevede una serie di cambiamenti all'interno della cellula, iniziando dalla capacità d'invasione locale. Lo step successivo è l'intravasazione delle cellule tumorali nei vasi sanguigni e linfatici vicini, con transito delle cellule tumorali attraverso i sistemi linfatico e sanguigno. Vi è poi la fuoriuscita di cellule tumorali dal lume vasale (extravasazione) con l'arrivo nel parenchima tissutale di destinazione e formazione di piccoli noduli di cellule tumorali (micrometastasi). Infine vi è la crescita delle micro-lesioni a tumori macroscopici (ref). Questo studio *In vitro* permette di estrapolare un *hallmark* neoplastico e vedere come un trattamento potrebbe modificare quest'aspetto delle cellule tumorali. Il saggio di chemoinvasione è stato fatto (Wiggins and Rappoport, 2010) per dimostrare come il trattamento con K:D-rib alla concentrazione di 5 mM potrebbe modificare il potenziale tumorigenico del carcinoma mammario umano Hs 578T. Il saggio di chemoinvasione permette di studiare sia il potenziale invasivo che il potenziale migratorio della linea cellulare Hs 578T, in seguito ad uno stimolo chemiotattico. Il chemoattrattore da noi utilizzato è FBS (siero fetale bovino) posto all'interno dell'agar.

La linea cellulare Hs 578T è in grado di migrare attraverso il vetrino verso lo spot d'agar con all'interno FBS e di invaderlo durante le 48 h di durata del saggio. Come mostrato in figura 4.8 la

linea cellulare Hs 578T mostra potenziale chemoinvasivo. Dalle foto è evidente come le cellule contattano lo spot d'agar da tutte le direzioni non privilegiandone nessuna. È così possibile asserire che lo spot offre una resistenza omogenea all'invasione. Al contrario lo spot AGAR senza FBS non esercita gli stessi stimoli per le cellule Hs 578T che si accumulano sul bordo senza contattare lo spot, fungendo così da controllo negativo.

Come possiamo notare dalla figura 4.7 abbiamo una progressiva diminuzione del potenziale chemoinvasivo con l'aumento della durata del trattamento. Il saggio d'invasione chemotattica è stato effettuato anche sospendendo il trattamento durante il saggio: il numero di cellule dopo sette giorni di trattamento e due di sospensione sono risultati essere uguali a quelli dopo cinque giorni di trattamento e due di saggio con trattamento. Questo ha dimostrato che la capacità chemoinvasiva rimane modificata anche dopo due giorni di sospensione.

I risultati relativi alle curve di proliferazione, alla capacità clonogenica ed al saggio di chemoinvasione mostrano che K:D-rib già alla concentrazione di 5 mM interferisce due *hallamrks* della linea cellulare Hs 578T: **la proliferazione ed il potenziale tumorigenico**. Le curve di crescita e la capacità clonogenica mostrano chiaramente come il K:D-rib può interferire con la proliferazione cellulare ed il conseguente allungamento del ciclo. Il potenziale tumorigenico (espresso come numero di cellule relativo) dopo nove giorni di trattamento, sette giorni di pretrattamento e nove giorni di saggio di chemoinvasione diminuisce di quasi 80% rispetto al controllo. Inoltre alla concentrazione di 5mM non si registra una mortalità cellulare elevata o una spiccata tossicità del composto nei confronti delle cellule in trattamento. Si registra solo un progressivo aumento dell'effetto senza alcun adattamento al trattamento, nemmeno dopo periodi di tempo di trattamento molto lunghi.

5.7 PROLIFERAZIONE Hs 578Bst

La linea cellulare Hs 578Bst è stato l'altro modello di studio utilizzato per investigare gli effetti del K:D-rib 5mM. La linea cellulare in questione è epitelio mammario umano non tumorale non immortalizzato. È tutto ciò che di più vicino ad un tessuto sano si può avere in laboratorio. Inoltre di questa linea cellulare è che è stata stabilizzata dalla stessa paziente dalla quale è stata stabilizzata la linea Hs 578T; questa costituiva la regione circostante il tumore. Un pattern cellulare di questo tipo fornisce in guadagno informativo notevole in quanto abbiamo due modelli cellulare differenti aventi però un comune denominatore biologico, ossia provengono dalla stessa paziente. Lo studio degli effetti del K:D-rib sulla proliferazione della linea cellulare Hs 578Bst è stato rilevato attraverso il numero di *split*, come è stato fatto per la prima curva di crescita delle Hs 578Bst. La

linea Hs 578Bst è stata trattata per 25 giorni con K:D-rib alla concentrazione di 5 mM, non mostra tossicità rilevante e nemmeno un significativo tasso di rallentamento della proliferazione cellulare: si ritiene infatti che, sebbene il controllo sia stato splittato 4 volte mentre il trattato è stato splittato 3 volte. Riteniamo che questa diminuzione della velocità di crescita rientri nell'errore sperimentale dovuto all'utilizzo del n° di split come indice della proliferazione cellulare e non al trattamento con K:D-rib 5mM. Questo punto è supportato dalle immagini in figura 3.13 e 3.14. Sono riportate immagini acquisite al microscopio ottico (ingrandimento 10X) di cellule Hs 578Bst rispettivamente del controllo all'undicesimo giorno di crescita e del trattato al diciottesimo giorno di trattamento. Come possiamo notare la morfologia cellulare non è cambiata tra l'undicesimo ed il diciottesimo giorno di trattamento e sono perfettamente comparabili. Non sono rilevabili cambiamenti morfologici dovuti al trattamento con K:D-rib 5mM.

Un ulteriore studio sulla proliferazione è stato condotto comparando i singoli componenti del K:D-rib alla concentrazione di 5mM, D-ribosio e KHCO_3 , con il K:D-rib 5 mM. Come indice di proliferazione si è utilizzato ancora una volta il n° di *split*. Le cellule trattate con il KHCO_3 e le cellule di controllo mostrano lo stesso andamento. Il primo split è stato fatto all'ottavo giorno ed il secondo è stato fatto al sedicesimo giorno; una volta alla settimana. Mentre le cellule trattate con il K:D-rib e con il D-ribosio sono state splittate anch'esse due volte: la prima volta sono state splittate all'ottavo giorno mentre la seconda volta sono state splittate al diciannovesimo giorno. Possiamo ritenere che il rallentamento della proliferazione delle cellule Hs 578Bst trattate con D-ribosio e K:D-rib rientri nell'errore sperimentale anche perché confortando le immagini dei quattro esperimenti non si notano cambiamenti morfologici.

5.8 DNAzima E G-QUADRUPLEX SENSORI DI K^+

Il DNAzima come dice la parola stessa è un enzima a DNA. È costituito da oligonucleotidi a DNA ricchi in guanine opportunamente foldati in strutture chiamate G-quadruplex, ovvero tetradi di guanine impilate le une sopra le altre. Il corretto folding garantisce alle molecole un'alta affinità per l'emina, la componente catalitica dell'enzima. Il DNAzima è stato visto avere potere catalitico alla stregua di una perossidasi e la sua attività catalitica non prescinde dal corretto folding dei G-quadruplex. In letteratura vi sono numerose evidenze sperimentali che dimostrano la correlazione fra il corretto folding dei G-quadruplex e la presenza di ioni metallici quali: K^+ , Na^+ , Li^+ , Pb^{2+} , Ag^+ ecc (Dai et al., 2006). Lo ione per cui i G-quadruplex manifestano più affinità per il *folding* è termodinamicamente più stabile è lo ione K^+ e per contro l'attività catalitica del DNAzima è superiore alla presenza dei G-quadruplex foldati in presenza di Na^+ (Travascio et al., 1998).

Per questo motivo si è scelto di utilizzare il DNAzima come biosensore dello ione potassio e non per la sua attività perossidasi.

In letteratura il DNAzima è foldato in un buffer di spettroscopia in cui è presente K^+ , che coordina e stabilizza il folding dei G-quadruplex. I G-quadruplex solitamente sono foldati in presenza di sali come: KCl, CH_3COOK a diverse concentrazioni. Travascio e colleghi utilizzano una soluzione di folding di 40 mM e 20 mM di CH_3COO-K^+ . Poiché il nostro scopo è misurare se il potassio entra nella cellula occorre che il "sistema DNAzima" sia sensibile alle concentrazioni da noi usate. Negli esperimenti di biologia cellulare, com'è stato in precedenza riportato, le concentrazioni di K:D-rib da noi utilizzate variano da 5 mM a 15 mM, ed essendo il K^+ in rapporto stechiometrico 3:1 con il K:D-rib, la concentrazione di K^+ nelle soluzioni di K:D-rib varia da 15mM a 45mM. Per quanto riguarda i campioni che hanno come fonte di potassio DMEM, DMEM con K:D-rib 5mM, il surnatante delle cellule Hs 578T di controllo ed il surnatante delle cellule Hs 578T trattate con K:D-rib 5mM, occorre considerare che il DMEM ha una concentrazione da *data sheet* pari a 5mM di K^+ . Tuttavia per preparare i campioni di ottica si è reso necessario diluire le soluzioni di partenza di un fattore tre, quindi i campioni relative al K:D-rib 5mM contengono una concentrazione pari a 5mM di K^+ . Pertanto i campioni misurati in figura 4.12 avranno una concentrazione che varia da 1.6 mM K^+ del solo DMEM a 6.6 mM K^+ del DMEM con K:D-rib 5mM. Tali concentrazioni sono inferiori a quelle riportate in letteratura. Il primo passo è stato studiare il folding del DNAzima con un sale, fonte di K^+ , diverso ed ad una concentrazione inferiore da quelli riportati in letteratura.

Dalla figura 4.12, come descritto nel paragrafo 4.1, emerge chiaramente che il DNAzima si folda in modo corretto nonostante il sale fosse diverso e la concentrazione più bassa rispetto a quelle utilizzate in letteratura.

Possiamo dedurre che l'interazione ionica tra lo ione K^+ , derivante dalla dissociazione del $KHCO_3$, ed il D-ribosio sia termodinamicamente più debole rispetto all'affinità tra il K^+ e gli otto ossigeni delle tetradi di guanine che partecipano al folding dei G-quadruplex.

Inoltre possiamo dire che il punto cruciale del folding del DNAzima non sia la tipologia di sale di potassio, ma è lo ione potassio, supportando l'ipotesi che il *folding* non dipenda dal sale utilizzato. Testata la fattibilità sperimentale si è passati alla misura dell'*uptake* dello ione potassio da parte delle cellule Hs 578T trattate con K:D-rib 5mM per 48h. Ci si è domandati se il surnatante delle cellule potesse fornire la quantità di ioni potassio necessaria per foldare il DNAzima e se le componenti del solo mezzo di coltura potessero in un qualche modo dare problemi all'acquisizione dello spettro UV/VIS del DNAzima. In figura 4.13 sono riportati gli spettri relativi ai quattro campioni: DMEM con K:D-rib 5mM, DMEM, surnatante Hs 578T trattato con K:D-rib 5mM e surnatante delle cellule Hs 578T. Dalla figura 4.13 è evidente la formazione di DNAzima per tutti i quattro campioni. Lo spettro del DNAzima foldato in presenza di ioni potassio provenienti dal DMEM con K:D-rib 5mM presenta l'assorbanza maggiore dello spettro del DNAzima foldato in presenza di ioni potassio provenienti dal surnatante delle cellule Hs 578T trattate con K:D-rib 5mM. Questo dimostra un *uptake* di ioni potassio da parte delle cellule Hs 578T. Gli spettri del DNAzima foldato in presenza di potassio proveniente DMEM e dal surnatante delle cellule non trattate, sono identici e perfettamente sovrapponibili. Da questo si può dedurre che il potassio presente nel mezzo di coltura cellulare non è trasportato all'interno delle cellule tumorali. Questi dati inoltre mostrano che sensore DNAzima è sensibile a concentrazioni di potassio dell'ordine del millimolare. A conclusione di quest'esperimento tuttavia rimangono aperte delle domande, tra cui come fa il DNAzima ad essere sensibile a variazioni di potassio dell'ordine del millimolare e qual è il range di maggior sensibilità di questo sensore?

Per rispondere a questa domanda abbiamo iniziato esperimenti di Dicroismo Circolare che permette di caratterizzare i cambiamenti conformazionali di strutture a G-quadruplex. L'oligonucleotide utilizzato è il PS2.M presente in letteratura insieme al PS5.M (Travascio et al., 1998) ha le stesse caratteristiche di DNAzima ma è maggiormente studiato con il CD; l'interpretazione di molti risultati di CD è stata impegnativa fino a quando non c'è stato un certo numero di strutture G-quadruplex disponibili per farne un confronto. Al momento abbiamo realizzato un esperimento preliminare per verificare il cambiamento di conformazione da struttura antiparallela, a parallela all'aumentare della concentrazione di potassio. In letteratura è stato visto che la conformazione parallela è la migliore sia per il binding dell'emina che per l'attività perossidasi (Lipps and Rhodes, 2009). Tramite la spettroscopia CD possiamo riconoscere diverse conformazioni, in particolare una banda positiva vicino a 260 nm e una negativa intorno a 240

indica una conformazione per lo più parallela mentre una banda positiva intorno a 290 nm e negativa intorno a 260 nm è consistente con una conformazione antiparallela (Paramasivan et al., 2007). Dai dati riportati in figura 4.15 confermano che il PS2.M cambia conformazione da antiparallela a parallela all'aumentare della concentrazione di KCl e che la massima variazione da una struttura all'altra si ha nel range 30 mM - 40mM. L'idea da sviluppare dovrebbe essere quella di portarci in questo range di concentrazioni di potassio, aggiungendo sali potassio, per utilizzare al meglio il sensore a G-quadruplex come sensore di potassio.

5.9 AFM - RIARRANGIAMENTI DI MEMBRANA IN Hs 578T

La microscopia a forza atomica (AFM) impiegata per l'analisi e lo studio sia di cellule fissate che di cellule vive in ambienti fisiologici, si è imposta per offrire un deciso cambio di passo nella ricerca della biologia cellulare. Con la possibilità di mappare, la topografia e la morfologia cellulare, le strutture delle proteine di superficie e dei loro pattern di espressione e lo studio delle proprietà meccaniche delle cellule grazie alla spettroscopia di forza, AFM rappresenta un *plus* all'insieme di strumenti che il biologo cellulare può avere a disposizione (Francis et al., 2010; Li et al., 2008).

La linea cellulare Hs 578T è stata trattata per una settimana con K:D-rib 5mM e si è valutata la presenza cambiamenti morfologici correlabili al trattamento. Le indagini morfologiche sono state condotte tramite AFM. Le regioni scelte per quest'analisi sono state le regioni perinucleari e le regioni confinanti con esse. Le regioni in questione sono topograficamente ben distinte, con ruoli ed architetture differenti, nonostante distino solo decine di micron tra loro. La regione circostante il nucleo o perinucleare è interessante in quanto nella parte sottostante si trovano il reticolo endoplasmatico rugoso in stretta connessione sia con l'apparato di Golgi che con il nucleo. Questi organelli sono sede della sintesi proteica e delle modificazioni post traduzionali. L'apparato di Golgi inoltre ha la funzione di rielaborare, selezionare ed esportare i prodotti cellulari. Il Golgi può interagire con altri organelli per indirizzare vescicole contenenti prodotti cellulari verso o verso altri organelli oppure indirizzare le vescicole verso la membrana plasmatica laddove si fonderanno e riverseranno il contenuto all'esterno.

Dall'analisi della zona perinucleare delle cellule non trattate, con l'utilizzo del *line profile*, figura 4.24 e dalla visualizzazione 3D, figura 4.22, si deduce il riarrangiamento della membrana, con la visualizzazione di strutture simili a porosomi, vedi figura 5.1.

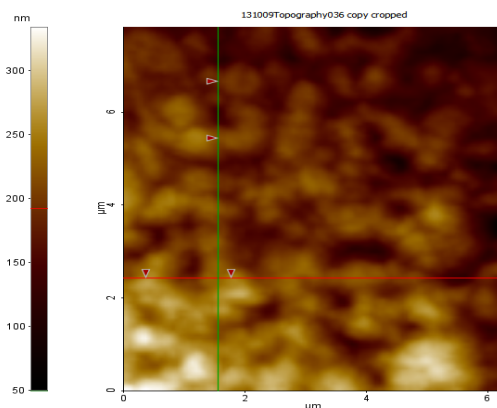


Figura 5.1: Ingrandimento di un particolare della figura regione prossimale il nucleo, appartenente ad una cellula in non trattata. I marker individuano le strutture porosomiche.

5.10 AFM – EFFETTI PROTETTIVI K:D-RIB SU Hs 578 Bst

La linea cellulare non tumorale Hs 578Bst è stata pre-trattata con K:D-rib, soluzione acquosa di D-ribosio e KHCO_3 , 5mM. Successivamente è stata irraggiata con due dosi da 2 Gy ciascuna di raggi X, in accordo con i protocolli radioterapeutici convenzionali per il trattamento del carcinoma mammario ed anche con esperimenti d'irraggiamento condotti in *in vitro* su linee cellulari (Fan et al., 2013; Kaidar-Person et al., 2013; Li et al., 2012). L'intento è stato quello di mimare un trattamento radioterapico, in quanto si è scelta una dose totale di 4 Gy e frazionata in due dosi da 2 Gy ciascuna. Ci si è posti il problema di come potesse reagire un tessuto non tumorale durante un trattamento di radioterapia valutando l'effetto protettivo del K:D-rib alla concentrazione di 5mM. Abbiamo dimostrato che il K:D-rib ha proprietà antiossidanti ed in virtù di questo potrebbe proteggere le cellule irraggiate dagli effetti delle radiazioni ionizzanti.

In questo studio come mostrato in figura 4.39 i target biologici scelti sono differenti da quelli normalmente oggetto di studio. In letteratura infatti molti lavori sul danno da radiazioni hanno come oggetto il danno al DNA, l'efficacia dei meccanismi di riparo al danno ed eventuali induzione d'eventi apoptotici e la radioresistenza.

In questo lavoro invece ci si è focalizzati sui danni alla struttura di membrana o citoscheletrica, indagando le regioni di connessione fra cellula e supporto di crescita o aree in cui in cui la membrana, e le fibre citoscheletriche connesse, sono particolarmente evidenti.

Anche in questo caso si tratta di un'analisi morfologica con microscopia a forza atomica (AFM - ParkXE100) in modalità *non-contact* e in aria.

La cellula di controllo nelle sue aree scansionate mostra un ordine strutturale, si prenda ad esempio la figura 4.43. È riscontrabile inoltre una direzionalità delle fibre citoscheletriche connesse alla membrana, come mostrato in Figura 4.40. Anche l'area della figura 4.46 è caratterizzata da un'omogeneità della struttura sia come citoscheletro che come membrana confermata dal *line profile* (figura 4.47). Il bordo è ben definito ed anche la regione selezionata dal *line profile* è piuttosto omogenea in quanto le differenze delle ordinate dei cursori rossi, che delimitano l'estremità delle regioni incluse, circa 10 nm.

Le cellule trattate con K:D-rib sono state analizzate nello stesso modo. Sono state scelte regioni in cui la membrana fosse sollecitata dal citoscheletro sottostante così da avere una struttura citoscheletrica riconoscibile durante la misura AFM (figura 4.49). La visualizzazione tridimensionale della regione in figura 4.50 mostra un'organizzazione spaziale paragonabile a quella del controllo. Questo lo si può notare anche dai *line profile* ortogonali riportati in figura 4.51. Le altezze maggiori sono quelle relative ai bordi, circa 50 nm. Anche nelle figura 4.52. si riconosce l'organizzazione delle fibre citoscheletriche connesse alla membrana cellulare e l'ordine

Bibliografia

- A R Green, D.G.P., E A Rakha, D Soria, C Lemetre, C C Nolan, F F T Barros, R D Macmillan, and J M Garibaldi, G.R.B.a.I.O.E. (2013) Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers. *British Journal of Cancer*
- Albini, A., Benelli, R., Noonan, D.M. and Brigati, C. (2004) The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *International Journal of Developmental Biology* 48, 563-571.
- Albini, A. and Noonan, D.M. (2010) The 'chemoinvasion' assay, 25 years and still going strong: the use of reconstituted basement membranes to study cell invasion and angiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 677-689.
- Amaral, A.F., Marques, M.M., da Silva, J.A.L. and Frausto da Silva, J.J.R. (2008) Interactions of D-ribose with polyatomic anions, and alkaline and alkaline-earth cations: possible clues to environmental synthesis conditions in the pre-RNA world. *New Journal of Chemistry* 32, 2043-2049.
- Anichini, C., Lotti, F., Pietrini, A., Lo Rizzo, C., Longini, M., Proietti, F., Felici, C. and Buonocore, G. (2013) Antioxidant Effects of Potassium Ascorbate with Ribose in Costello Syndrome. *Anticancer Research* 33, 691-695.
- Anichini C, L.F., Longini M, Proietti F, Felici C, Perrone S, Buonocore G. (2012) Antioxidant effects of potassium ascorbate with ribose therapy in a case with Prader Willi Syndrome.
- Antonacci, C., Chaires, J.B. and Sheardy, R.D. (2007) Biophysical characterization of the human telomeric (TTAGGG)(4) repeat in a potassium solution. *Biochemistry* 46, 4654-4660.
- Azam, F., Mehta, S. and Harris, A.L. (2010) Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *European Journal of Cancer* 46, 1323-1332.
- Ball, P. (2013) Killing me softly. *Physics world*
- Becchetti, A., Munaron, L. and Arcangeli, A. (2013) The role of ion channels and transporters in cell proliferation and cancer. *Frontiers in physiology* 4, 312.
- Bergers, G. and Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer* 8, 592-603.
- Berridge, M.V., Herst, P.M. and Tan, A.S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, Vol 11 11, 127-152.
- Berx, G. and van Roy, F. (2009) Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1.
- Blackburn, E.H. (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* 408, 53-56.
- Brooks, T.A., Kendrick, S. and Hurley, L. (2010) Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *Febs Journal* 277, 3459-3469.
- Bruni, L. and Croci, S. (2012) K:D-Rib: Cancer cell proliferation inhibitor and DNAzyme folding promoter. 85° convegno Società Italiana di Biologia Sperimentale Parma Italia, pp. 65-66.
- Cao, Y., DePinho, R.A., Ernst, M. and Vousden, K. (2011) Cancer research: past, present and future. *Nature Reviews Cancer* 11, 749-754.

- Cartlidge, E. (2013) Breast cells in a spin. *Physics world*.
- Cartwright, J. (2013) An electrical misunderstanding. *Physics world*.
- Chakrabarti, R., Kundu, S. and Kumar, S. (2000) Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin c. *Journal of Cellular Biochemistry* 80, 133-138.
- Chan, B.A. and Coward, J.I.G. (2013) Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease* 5, S565-S578.
- Charak, S. and Mehrotra, R. (2013) Structural investigation of idarubicin-DNA interaction: Spectroscopic and molecular docking study. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 213-218.
- Chen, J.-Q., Contreras, R., Wang, R., Fernandez, S., Shoshani, L., Russo, I., Cerejido, M. and Russo, J. Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac.
- Cheng, X., Liu, X., Bing, T., Cao, Z. and Shangguan, D. (2009) General Peroxidase Activity of G-Quadruplex-Hemin Complexes and Its Application in Ligand Screening. *Biochemistry* 48, 7817-7823.
- Clavarezza, M., Mustacchi, G., Gardini, A.C., Del Mastro, L., De Matteis, A., Riccardi, F., Adamo, V., Aitini, E., Amoroso, D., Marchetti, P., Gori, S., Carrozza, F., Maiello, E., Giotta, F., Dondi, D. and Venturini, M. (2012) Biological characterization and selection criteria of adjuvant chemotherapy for early breast cancer: experience from the Italian observational NEMESI study. *Bmc Cancer* 12.
- Collie, G.W. and Parkinson, G.N. (2011) The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chemical Society Reviews* 40, 5867-5892.
- Croci, S., Bruni, L., Bussolati, S., Castaldo, M. and Dondi, M. (2011) Potassium bicarbonate and D-ribose effects on A72 canine and HTB-126 human cancer cell line proliferation in vitro. *Cancer Cell International*.
- Croci, S., Pedrazzi, G., Paoli, G., Monetti, D. and Ortalli, I. (2002) Potassium ascorbate as protective agent in the oxidation of the red blood cells. *Hyperfine Interactions (C)*, Vol 5, Proceedings, 241-244.
- Cross, S.E., Jin, Y.-S., Rao, J. and Gimzewski, J.K. (2007) Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology* 2, 780-783.
- Dai, J.X., Dexheimer, T.S., Chen, D., Carver, M., Ambrus, A., Jones, R.A. and Yang, D.Z. (2006) An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution. *Journal of the American Chemical Society* 128, 1096-1098.
- Darzynkiewicz, P.P.a.Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry.
- Davis, R.J. and Daly, J.M. (1984) Potassium depletion and malignant transformation of villous adenomas of the colon and rectum. *Cancer* 53, 1260 - 1264.
- Diaz, G., Melis, M., Musinu, A., Piludu, M., Piras, M. and Falchi, A.M. (2007) Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. *European Journal of Histochemistry* 51, 213-218.
- Dunnwald, L.K., Rossing, M.A. and Li, C.I. (2007) Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 9.
- Ebos, J.M.L., Lee, C.R. and Kerbel, R.S. (2009) Tumor and Host-Mediated Pathways of Resistance and

Disease Progression in Response to Antiangiogenic Therapy. *Clinical Cancer Research* 15, 5020-5025.

Elena, J.W., Travis, L.B., Simonds, N.I., Ambrosone, C.B., Ballard-Barbash, R., Bhatia, S., Cerhan, J.R., Hartge, P., Heist, R.S., Kushi, L.H., Lash, T.L., Morton, L.M., Onel, K., Pierce, J.P., Robison, L.L., Rowland, J.H., Schrag, D., Sellers, T.A., Seminara, D., Shu, X.O., Thomas, N.E., Ulrich, C.M. and Freedman, A.N. (2013) Leveraging Epidemiology and Clinical Studies of Cancer Outcomes: Recommendations and Opportunities for Translational Research. *Jnci-Journal of the National Cancer Institute* 105, 85-94.

Ellis, L.M. and Reardon, D.A. (2009) CANCER The nuances of therapy. *Nature* 458, 290-292.

Eriksson, M., Anveden, L., Celebioglu, F., Dahlberg, K., Meldahl, I., Lagergren, J., Eriksen, C. and de Boniface, J. (2013) Radiotherapy in implant-based immediate breast reconstruction: risk factors, surgical outcomes, and patient-reported outcome measures in a large Swedish multicenter cohort. *Breast Cancer Research and Treatment* 142, 591-601.

Fan, X.Y., Li, H.T., Zhao, J., Lin, F.B., Zhang, L.L., Zhang, Y.Y. and Yao, S.Z. (2012) A novel label-free fluorescent sensor for the detection of potassium ion based on DNAzyme. *Talanta* 89, 57-62.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D. and Bray, F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 49, 1374-1403.

Folkman, J. and Kalluri, R. (2004) Cancer without disease. *Nature* 427, 787-787.

Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1, 2315-2319.

Freeman, M.L., Mertens-Talcott, S.U., Cyr, J.S. and Percival, S.S. (2008) Ribose enhances retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells. *Nutrition Research* 28, 775-782.

Galimberti, V., Cole, B.F. and Zurrada, S. (2013) Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial (vol 14, pg 297, 2013). *Lancet Oncology* 14, E254-E254.

Gallagher, E.J. and LeRoith, D. (2013) Epidemiology and Molecular Mechanisms Tying Obesity, Diabetes, and the Metabolic Syndrome With Cancer. *Diabetes Care* 36, S233-S239.

George, S.M., Irwin, M.L., Smith, A.W., Neuhouser, M.L., Reedy, J., McTiernan, A., Alfano, C.M., Bernstein, L., Ulrich, C.M., Baumgartner, K.B., Moore, S.C., Albanes, D., Mayne, S.T., Gail, M.H. and Ballard-Barbash, R. (2011) Postdiagnosis diet quality, the combination of diet quality and recreational physical activity, and prognosis after early-stage breast cancer. *Cancer Causes & Control* 22, 589-598.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thuerlimann, B., Senn, H.J. and Panel, M. (2011) Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* 22, 1736-1747.

Hackett AJ, S.H., Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL, Gardner MB. (1977) Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J Natl Cancer Inst.*

Hajdu, S.I. (2011) A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 117, 1097-102.

Hampel, S.M., Pepe, A., Greulich-Bode, K.M., Malhotra, S.V., Reszka, A.P., Veith, S., Boukamp, P. and Neidle, S. (2013) Mechanism of the Antiproliferative Activity of Some Naphthalene Diimide G-

Quadruplex Ligands. *Molecular Pharmacology* 83, 470-480.

- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.
- Heng, H.H., Bremer, S.W., Stevens, J.B., Horne, S.D., Liu, G., Abdallah, B.Y., Ye, K.J. and Ye, C.J. (2013) Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution. *Cancer and Metastasis Reviews* 32, 325-340.
- Huppert, J.L. and Balasubramanian, S. (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* 35, 406-413.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y. and Ueno, K. (1996) A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19, 1518-1520.
- Jan Palacky¹, M.V.c.k.,^{3,*}, Iva Kejnovska^{2,3} and Peter Mojzes[~] (2012) Polymorphism of human telomeric quadruplex structure controlled by DNA concentration: a Raman study. *Nucleic Acids Res.* 2012
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) Global Cancer Statistics. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 61, 69-90.
- Kaidar-Person, O., Lai, C., Kuten, A., Belkacemi, Y. and Arome (2013) "The Infinite Maze" of breast cancer, signaling pathways and radioresistance. *Breast* 22, 411-418.
- Kellner, U., Rudolph, P. and Parwaresch, R. (2000) Human DNA-topoisomerases - Diagnostic and therapeutic implications for cancer. *Onkologie* 23, 424-430.
- Ksiazkiewicz, M., Markiewicz, A. and Zaczek, A.J. (2012) Epithelial-Mesenchymal Transition: A Hallmark in Metastasis Formation Linking Circulating Tumor Cells and Cancer Stem Cells. *Pathobiology* 79, 195-208.
- L. Bruni, N.A.A.B., S. Croci (2012) Crescita tumorale in vitro: misure di K⁺ extracellulare. SOCIETA' ITALIANA DI FISICA. - XCVIII CONGRESSO NAZIONALE. Napoli, 17-24 settembre 2012.
- Larisa Belyanskaya, P.M., Philipp Spohn, Arie Bruinink, Peter Wick, (2007) The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction.
- Li, J.-Y., Li, Y.-Y., Jin, W., Yang, Q., Shao, Z.-M. and Tian, X.-S. (2012) ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 31.
- Luo, J., Solimini, N.L. and Elledge, S.J. (2009) Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction (vol 136, pg 823, 2009). *Cell* 138, 807-807.
- Luu, K.N., Phan, A.T., Kuryavyi, V., Lacroix, L. and Patel, D.J. (2006) Structure of the human telomere in K⁺ solution: An intramolecular (3+1) G-quadruplex scaffold. *Journal of the American Chemical Society* 128, 9963-9970.
- Matthijs V. Nijenhuis, E.J.T.R. (2013) Who should not undergo breast conservation? *The Breast* 22, S110-S114.
- Mosmann, T. (1983) RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL - APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTO-TOXICITY ASSAYS. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Munagala, R., Aqil, F. and Gupta, R.C. (2011) Promising molecular targeted therapies in breast cancer.

Indian Journal of Pharmacology 43, 236-245.

- Negrini, S., Gorgoulis, V.G. and Halazonetis, T.D. (2010) Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 220-228.
- Norden, A.D., Drappatz, J. and Wen, P.Y. (2009) Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nature Reviews Neurology* 5, 610-620.
- Okano, K. (2009) Synthesis and pharmaceutical application of L-ribose. *Tetrahedron* 65, 1937-1949.
- Ortiz, P., Fernandez-Bertran, J. and Reguera, E. (2005) Role of the anion in the alkali halides interaction with D-ribose: a H-1 and C-13 NMR spectroscopy study. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61, 1977-1983.
- Ouadid-Ahidouch, H. and Ahidouch, A. (2013) K(+) channels and cell cycle progression in tumor cells. *Frontiers in physiology* 4, 220-220.
- Pan, Y.Z., Zhou, A., Hu, Z.H. and Yu, A.M. (2013) Small Nucleolar RNA-Derived MicroRNA hsa-miR-1291 Modulates Cellular Drug Disposition through Direct Targeting of ABC Transporter ABCC1. *Drug Metabolism and Disposition* 41, 1744-1751
- Pantellini (1974) Legami Idrogeno ebsalificazione degli stessi da parte del K⁺ nella strutturazione della materia vivente.
- Parkinson, G.N., Lee, M.P.H. and Neidle, S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 417, 876-880.
- Pedersen, P.L. (2007) Warburg, me and hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39, 211-222.
- Pierre Murat, S. Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA.
- Plodinec, M., Loparic, M., Monnier, C.A., Obermann, E.C., Zanetti-Dallenbach, R., Oertle, P., Hyotyla, J.T., Aebi, U., Bentires-Alj, M., Schoenenberger, C.-A. and Lim, R.Y.H. (2013) The Nanomechanical Signature of Breast Cancer. *Biophysical Journal* 104, 321A-321A.
- Rebecca Ritte¹, K.T., Annekatrin Lukanova¹, Anne Tjønneland², Anja Olsen², Kim Overvad³, Laure Dossus⁴⁵, Agnès Fournier⁴⁵, Françoise Clavel-Chapelon⁴⁵, Verena Grote¹, Heiner Boeing⁶, Krasimira Aleksandrova⁶, Antonia Trichopoulou⁷⁸, Pagona Lagiou¹⁰⁷⁹, Dimitrios Trichopoulos¹⁰⁹, Domenico Palli¹¹, Franco Berrino¹², Amalia Mattiello¹³, Rosario Tumino¹⁴, Carlotta Sacerdote¹⁵¹⁶, José Ramón Quirós¹⁷, Genevieve Buckland¹⁸, Esther Molina-Montes¹⁹²⁰, María-Dolores Chirlaque²⁰²¹, Eva Ardanaz²⁰²², Pilar Amiano²⁰²³, H Bas Bueno-de-Mesquita²⁴²⁵, Carla H van Gils²⁶, Petra HM Peeters²⁶²⁷, Nick Wareham²⁸, Kay-Tee Khaw²⁹, Timothy J Key³⁰, Ruth C Travis³⁰, Elisabete Weiderpass³¹³²³³³⁴, Vanessa Dumeaux³¹³⁵, Eliv Lund³¹, Malin Sund³⁶, Anne Andersson³⁷, Isabelle Romieu³⁸, Sabina Rinaldi³⁹, Paulo Vineis¹⁶⁴⁰, Melissa A Merritt⁴⁰, Elio Riboli⁴⁰ and Rudolf Kaaks¹ (2013) Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and negative breast cancer: a cohort study.
- Sathasivam, S. (2008) Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. *Nature Clinical Practice Neurology* 4, 317-327.
- Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311-322.
- Siddik, Z.H. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22,

7265-7279.

- Song, K., Han, C., Zhang, J.Q., Lu, D.D., Dash, S., Feitelson, M., Lim, K. and Wu, T. (2013) Epigenetic Regulation of MicroRNA-122 by Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma and Hepatitis B Virus X Protein in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Hepatology* 58, 1681-1692.
- Stephanie M Nelson*, L.R.F.a.W.A.D. (2004) DNA and the chromosome – varied targets for chemotherapy.
- Taylor, A. and Powell, M.E.B. (2004) Intensity-modulated radiotherapy--what is it? *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society* 4, 68-73.
- Travascio, P., Li, Y.F. and Sen, D. (1998) DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex. *Chemistry & Biology* 5, 505-517.
- Trine Grantzau a, Lene Mellekjær b, Jens Overgaard a (2013) Second primary cancers after adjuvant radiotherapy in early breast cancer patients: A national population based study under the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). *Radiotherapy and Oncology* 106, 42-49.
- Tryfonidis, K., Boukovinas, I., Xenidis, N., Christophyllakis, C., Papakotoulas, P., Politaki, E., Malamos, N., Polyzos, A., Kakolyris, S., Georgoulas, V., Mavroudis, D. and Hellenic Oncology Res Grp, H. (2013) A multicenter phase I-II study of docetaxel plus epirubicin plus bevacizumab as first-line treatment in women with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast* 22, 1171-1177.
- Tubiana, M. (2009) Can we reduce the incidence of second primary malignancies occurring after radiotherapy? A critical review. *Radiotherapy and Oncology*, 4-15.
- Upadhyay, M., Samal, J., Kandpal, M., Singh, O.V. and Vivekanandan, P. (2013) The Warburg effect: Insights from the past decade. *Pharmacology & Therapeutics* 137, 318-330.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Verhoeff, J.J.C., van Tellingen, O., Claes, A., Stalpers, L.J.A., van Linde, M.E., Richel, D.J., Leenders, W.P.J. and van Furth, W.R. (2009) Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *Bmc Cancer* 9.
- Vincent, M.D. (2011) Cancer: Beyond Speciation. In Gisselsson, D. (ed.), *Intratumor Diversity and Clonal Evolution in Cancer* Advances in Cancer Research Vol. 112, pp. 283-350.
- Vistica, D.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M.R. (1991) TETRAZOLIUM-BASED ASSAYS FOR CELLULAR VIABILITY - A CRITICAL-EXAMINATION OF SELECTED PARAMETERS AFFECTING FORMAZAN PRODUCTION. *Cancer Research* 51, 2515-2520.
- Voet (2013) *Fondamenti di biochimica*.
- Warburg, O. (1930) *Ueber den stoffwechsel der tumoren*. London UK: Constable
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* 123, 309-14.
- Wei, C. and Pohorille, A. (2009) Permeation of Membranes by Ribose and Its Diastereomers. *Journal of the American Chemical Society* 131, 10237-10245.
- Weichenhan, D. and Plass, C. (2013) The evolving epigenome. *Human Molecular Genetics* 22, R1-R6.
- Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E. and Oun, R. (2010) The status of platinum anticancer drugs in the

clinic and in clinical trials. Dalton Transactions 39, 8113-8127.

Wiggins, H.L. and Rappoport, J.Z. (2010) An agarose spot assay for chemotactic invasion. Biotechniques 48, 120-123.

Witting, P.K., Travascio, P., Sen, D. and Mauk, A.G. (2001) A DNA oligonucleotide-hemin complex cleaves t-butyl hydroperoxide through a homolytic mechanism. Inorganic Chemistry 40, 5017-5023.

Wu, Y. and Brosh, R.M., Jr. (2010) G-quadruplex nucleic acids and human disease. Febs Journal 277, 3470-3488.

Xu, Y., Noguchi, Y. and Sugiyama, H. (2006) The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)(3)] in K⁺ solution. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14, 5584-5591.

Yang, D.Z. and Okamoto, K. (2010) Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. Future Medicinal Chemistry 2, 619-646.

Yang, X.R., Chang-Claude, J., Goode, E.L., Couch, F.J., Nevanlinna, H., Milne, R.L., Gaudet, M., Schmidt, M.K., Brooks, A., Cox, A., Fasching, P.A., Hein, R., Spurdle, A.B., Blows, F., Driver, K., Flesch-Janys, D., Heinz, J., Sinn, P., Vrieling, A., Heikkinen, T., Aittomäki, K., Heikkilä, P., Blomqvist, C., Lissowska, J., Peplonska, B., Chanock, S., Figueroa, J., Brinton, L., Hall, P., Czene, K., Humphreys, K., Darabi, H., Liu, J., Van 't Veer, L.J., Van Leeuwen, F.E., Andrulis, I.L., Glendon, G., Knight, J.A., Mulligan, A.M., O'Malley, F.P., Weerasooriya, N., John, E.M., Beckmann, M.W., Hartmann, A., Wehbrecht, S.B., Wachter, D.L., Jud, S.M.S., Loehberg, C.R., Baglietto, L., English, D.R., Giles, G.G., McLean, C.A., Severi, G., Lambrechts, D., Vandrope, T., Weltens, C., Paridaens, R., Smeets, A., Neven, P., Wildiers, H., Wang, X., Olson, J.E., Cafourek, V., Fredericksen, Z., Kosel, M., Vachon, C., Cramp, H.E., Connley, D., Cross, S.S., Balasubramanian, S.P., Reed, M.W.R., Doerk, T., Bremer, M., Meyer, A., Karstens, J.H., Ay, A., Park-Simon, T.-W., Hillemanns, P., Arias Perez, J.I., Menendez Rodriguez, P., Zamora, P., Bentez, J., Ko, Y.-D., Fischer, H.-P., Hamann, U., Pesch, B., Bruening, T., Justenhoven, C., Brauch, H., Eccles, D.M., Tapper, W.J., Gerty, S.M., Sawyer, E.J., Tomlinson, I.P., Jones, A., Kerin, M., Miller, N., McInerney, N., Anton-Culver, H., Ziogas, A. et al. (2011) Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium Studies. Journal of the National Cancer Institute 103, 250-263.

Zhao, G., Li, C., Okoro, C.A., Li, J., Wen, X.J., White, A. and Balluz, L.S. (2013) Trends in modifiable lifestyle-related risk factors following diagnosis in breast cancer survivors. Journal of Cancer Survivorship 7, 563-569.

Zhou, J. and Giannakakou, P. (2005) Targeting microtubules for cancer chemotherapy. Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents 5, 65-71.

Zhou, X.F., Su, F.Y., Tian, Y.Q., Youngbull, C., Johnson, R.H. and Meldrum, D.R. (2011) A New Highly Selective Fluorescent K⁺ Sensor. Journal of the American Chemical Society 133, 18530-18533.

Chapter 3 TUMOR CELL MORPHOLOGY. Comparative Oncology.

Physics World - Talking cancer (2013)