



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA E DELL'AMBIENTE

Coordinatore: Prof. Salvatore Saccone

CLAUDIA GIOVANNA LEOTTA

**Localizzazione intranucleare ed espressione del
gene *HLXB9* nel differenziamento neuronale *in
vitro* e nell'insorgenza di disordini mielodi**

Tesi di dottorato

Tutor: Prof. Salvatore Saccone

XXVI ciclo

AA.AA. 2010÷2013

Indice

PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	5
RIASSUNTO	7
1. INTRODUZIONE	11
1.1 Il nucleo e i territori cromosomici	12
Organizzazione della cromatina nel nucleo interfase	12
Cambiamenti dell'organizzazione nucleare in cellule tumorali	17
Organizzazione della cromatina durante il differenziamento	18
1.2 Neoplasie ematologiche	21
Neoplasie delle linee cellulari mieloidi	22
Leucemia mieloide acuta	22
La linea cellulare leucemica GDM-1	24
1.3 Il cromosoma 6	29
Caratteristiche citogenetiche, molecolari e implicazioni patologiche	29
1.4 Il cromosoma 7	33
Caratteristiche citogenetiche, molecolari e implicazioni patologiche	33
1.5 Il gene <i>HLXB9</i>	36
Evoluzione, struttura ed espressione del gene	36
HLXB9: coinvolgimento nei tumori e nella sindrome di Currarino	40
La proteina HB9: il prodotto proteico del gene HLXB9	42
La proteina PTGER2	44
1.6 Il neuroblastoma	47
Origine dei neuroblasti e caratteristiche delle cellule nervose	47
Classificazione e genetica del neuroblastoma	48
Cellule SK-N-BE	51
I retinoidi e l'acido retinoico	52
1.7 Marcatori neuronali	55
La proteina GAP-43 (Growth associated protein 43)	55

La proteina Tau	57
1.8 Apoptosi	61
La staurosporina: apoptosi e differenziamento	64
1.9 Evoluzione	67
Il cariotipo dei Primati	67
Evoluzione del cromosoma 7	69
2. MATERIALI E METODI	72
2.1 Colture cellulari	73
Coltura di linfociti da sangue periferico	73
Colture di cellule stabilizzate	76
2.2 Ibridazione in situ fluorescente	79
Preparazione delle sonde	79
Marcatura del DNA sonda	81
FISH	82
Rilevazione del segnale	83
3D FISH	85
Localizzazione intranucleare bidimensionale	86
2.3 REAL-TIME PCR	88
Estrazione dell'RNA	88
Protocollo generale per real time PCR quantitativa	90
2.4 RT-PCR in situ	92
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	93
3.1 HLXB9: coinvolgimento nelle patologie leucemiche	94
Localizzazione intranucleare di HLXB9 in cellule della linea GDM-1	94
Possibili geni target del fattore di trascrizione HB9 in cellule ematopoietiche	108
Localizzazione intranucleare del gene HLXB9 in pazienti con disordini mieloidi	113
3.2 Espressione del gene HLXB9 in cellule nervose	116
Localizzazione intranucleare e analisi di espressione durante il differenziamento neuronale	116
Possibili geni target della proteina HB9 in cellule nervose	125
Localizzazione intranucleare ed espressione di HLXB9 durante l'apoptosi	129

3.3 Il gene <i>HLXB9</i> nelle cellule linfoblastoidi dei Primati	133
4. CONCLUSIONI	137
BIBLIOGRAFIA	140
RINGRAZIAMENTI	153

Premessa e scopo del lavoro

La presente tesi descrive il lavoro effettuato durante il triennio 2010-2013 nell'ambito del Dottorato di ricerca in Biologia Evoluzionistica e dell'Ambiente presso il laboratorio di Genetica della Sezione di Biologia Animale "M. La Greca" del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali dell'Università di Catania, sotto la guida del prof. S. Saccone. Una parte delle ricerche oggetto di questa tesi è stata svolta in collaborazione con la dott.ssa S. Tosi, nel laboratorio "Leukaemia and Chromosome Research" della Brunel University di Londra dove, in occasione del periodo di attività di ricerca svolta all'estero durante il primo anno di dottorato, sono stati effettuati diversi esperimenti.

Inoltre, alcuni esperimenti hanno preso spunto dalla collaborazione con la prof.ssa Laura Gil Alberdi (dell'Università "Alfonso X el Sabio" di Madrid, Spagna) che è stata ospite, per alcuni brevi periodi, presso il laboratorio di Genetica del prof. Saccone.

È noto che l'ambiente ha un forte impatto sul fenotipo umano e che l'esposizione ambientale, la scarsa qualità dell'aria, le esposizioni occupazionali, i pesticidi usati in agricoltura e le scelte personali sullo stile di vita, influenzano in modo importante la formazione e la progressione dei tumori. In particolare, nelle aree a forte inquinamento industriale è possibile osservare un incremento di patologie tumorali la cui causa è da ricercare nelle modificazioni del materiale genetico generate dagli effetti genotossici degli inquinanti cui gli individui sono esposti.

E' stato anche dimostrato che l'alterazione della funzionalità dei geni può essere associata non solo a specifiche mutazioni geniche o cromosomiche, ma anche a modificazioni nella loro posizione all'interno del nucleo senza necessariamente una mutazione della sequenza nucleotidica. In questo caso, anche composti chimici che non reagiscono direttamente con il DNA possono indurre malattie di tipo tumorale: il loro effetto potrebbe provocare un'alterazione dell'organizzazione della cromatina nel nucleo con conseguente riposizionamento genico e de-regolazione dell'attività trascrizionale. Analogamente, molecole di vario tipo presenti nell'ambiente potrebbero indurre una

riorganizzazione della cromatina nel nucleo con conseguente alterazione nei processi di differenziamento cellulare.

Il lavoro svolto nell'ambito del Dottorato di ricerca, e descritto nella presenti tesi, è stato rivolto verso lo studio della riorganizzazione della cromatina in cellule tumorali e durante il differenziamento cellulare per comprendere quanto sia rilevante, nell'insorgenza di patologie tumorali di tipo leucemico, il riposizionamento genico all'interno del nucleo con conseguente alterazione dell'attivazione/inattivazione dell'espressione dei geni coinvolti. Il lavoro è stato prevalentemente sviluppato ponendo particolare attenzione alla localizzazione intranucleare del gene *HLXB9* e ai suoi livelli di espressione in cellule ematopoietiche tumorali e non, in cellule nervose in varie fasi del differenziamento e in cellule linfoblastoidi di specie di Primati non umani. Inoltre, essendo il prodotto del suddetto gene un fattore di trascrizione si è cercato di identificare un possibile target comune nelle diverse tipologie cellulari prese in considerazione.

Riassunto

È noto che le regioni cromosomiche sono posizionate nel nucleo in accordo con il loro livello di GC e con la densità genica. Le regioni più ricche in GC sono localizzate più internamente nel nucleo e possiedono una struttura della cromatina aperta, al contrario delle regioni più povere in GC che hanno caratteristiche opposte. Questa distribuzione del DNA definisce due compartimenti nucleari aventi differenti livelli di espressione genica, infatti i fattori di trascrizione e di splicing sono localizzati più internamente nel nucleo mentre la periferia nucleare è occupata da eterocromatina trascrizionalmente inattiva.

La posizione intranucleare dei geni è quindi un parametro importante per definirne l'attivazione/inattivazione trascrizionale. Un'alterazione dell'organizzazione della cromatina, anche in risposta ad inquinanti ambientali, può determinare un riposizionamento genico a livello nucleare causando l'insorgenza di patologie varie e fra queste quelle tumorali.

E' anche noto che la riorganizzazione della cromatina è un evento fondamentale durante il processo di differenziamento cellulare che prevede l'attivazione o lo spegnimento, l'overespressione o la down-regolazione di diversi geni che permettono alla cellula di assumere le caratteristiche specifiche.

La tematica affrontata durante l'attività svolta nell'ambito della presente tesi di Dottorato di ricerca è stata la riorganizzazione della cromatina in cellule tumorali e durante il differenziamento cellulare. In particolare, l'attenzione è stata rivolta al gene *HLXB9*, conosciuto anche come *MNX1* (*motor neuron and pancreas homeobox*), la cui alterata posizione intranucleare è stata in precedenza descritta in diversi pazienti con leucemia mieloide acuta infantile.

Il gene *HLXB9* è localizzato sul cromosoma 7 nella banda q36.3. È un gene inattivo nei linfociti dopo lo sviluppo embrionale ma è espresso, oltre che in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta con traslocazione 7;12, nella linea cellulare GDM-1, derivata dal sangue periferico di una paziente con un disordine mieloproliferativo. È un gene coinvolto nel differenziamento dei motoneuroni e delle cellule beta pancreatiche con risvolti

patologici in presenza di delezioni che ne alterano la funzionalità come nel caso della Sindrome di Currarino.

Gli studi sono stati condotti in diverse direzioni: *HLXB9* è stato analizzato in linfociti normali e in cellule leucemiche, ed inoltre, essendo il suddetto gene implicato nel differenziamento dei motoneuroni, è stato analizzato in cellule SK-N-BE che, in presenza di acido retinoico, differenziano in cellule di tipo neuronale.

Nei linfociti ottenuti dal sangue periferico di pazienti con disordini mieloidi e nelle cellule della linea cellulare GDM-1 in cui è attivato il gene *HLXB9* è stata dimostrata una rilocalizzazione intranucleare del gene che si troverà riposizionato in un compartimento più interno del nucleo, dove viene attivamente trascritto, rispetto alla posizione più periferica occupata dal gene nei nuclei di linfociti normali.

Nella linea cellulare GDM-1 è stato evidenziato che sebbene sia presente una traslocazione, che coinvolge un cromosoma 7, essa non determina un riposizionamento intranucleare dell'allele di *HLXB9* coinvolto nel riarrangiamento. Inaspettatamente è stata invece osservata, con opportune combinazioni di sonde fluorescenti utilizzate in ibridazioni *in situ* su nuclei interfasici, la rilocalizzazione dell'allele *wild-type* (cioè quello localizzato nel cromosoma non coinvolto nella traslocazione) in una regione del nucleo più interna ed atipica rispetto alle normali cellule linfocitarie. Questa rilocalizzazione potrebbe essere la causa dell'overespressione del gene *HLXB9* nella linea cellulare GDM-1. In tali cellule, l'iperespressione di *HLXB9* è correlata con una sotto-espressione del gene *PTGER2* (regolato negativamente da *HLXB9*) che codifica per il recettore E2 della prostaglandina; in condizioni normali la prostaglandina ha un importante ruolo nell'omeostasi del midollo osseo con effetti tumore soppressivi che in questo caso verranno meno.

È stato inoltre evidenziato che i linfociti, ottenuti da sangue periferico, prelevati e posti in coltura con fitoemagglutinina per tre giorni, riacquistando lo stadio di blasti che permette loro un'attiva proliferazione, presentano una riattivazione del gene *HLXB9*. Questo fa ipotizzare che l'overespressione di *HLXB9* nella linea cellulare leucemica GDM-1, non essendo associata all'allele coinvolto nella traslocazione, possa essere dovuta ad

un meccanismo simile a quello coinvolto nell'attivazione indotta da fitoemagglutina, con riattivazione dell'allele non traslocato di *HLXB9*.

Gli studi effettuati su cellule di neuroblastoma SK-N-BE, sia in fase proliferativa che in fase di differenziamento indotto da acido retinoico, hanno evidenziato un riposizionamento intranucleare del gene *HLXB9* durante il differenziamento, cioè è stato osservato uno spostamento dalla parte più periferica del nucleo alla parte più interna. Il riposizionamento intranucleare di *HLXB9* è stato inoltre associato con il livello della sua espressione: molto bassa nelle primissime fasi differenziali, successivo incremento per un breve periodo e quindi riduzione fino a completa assenza del trascritto nelle fasi finali del differenziamento neuronale. Queste osservazioni sul comportamento di *HLXB9* nelle cellule SK-N-BE indicano che esso può essere utilizzato come un marker specifico degli stadi iniziali del differenziamento delle cellule nervose, da utilizzare insieme ad altri marcatori, già noti in letteratura, che caratterizzano però la cellula neuronale matura.

Una riattivazione del gene *HLXB9* è stata anche osservata nelle cellule SK-N-BE dopo induzione dell'apoptosi mediante l'utilizzo della Staurosporina. Questa osservazione è in linea con alcuni dati di letteratura che descrivono la Staurosporina come una molecola in grado di indurre, oltre che l'apoptosi, il differenziamento nella linea cellulare PC12 derivata da feocromocitoma e nella linea RGC-5 derivata da cellule gangliari della retina. *HLXB9* viene espresso nelle cellule di neuroblastoma SK-N-BE dopo solo venti minuti di trattamento con Staurosporina, mentre durante il differenziamento indotto da acido retinoico il trascritto compare dopo alcuni giorni. L'attivazione di *HLXB9* indotta da Staurosporina potrebbe essere la dimostrazione che la molecola aggiunta effettivamente induce processi di differenziamento cellulare, anche se in modo anomalo, perché dopo poche ore dal trattamento le cellule anziché differenziare in neuroni maturi acquisiscono la tipica morfologia delle cellule apoptotiche.

Per identificare i possibili target del fattore di trascrizione codificato da *HLXB9* sono stati analizzati diversi geni, quali *MYCN*, *ZYX* e *PTGER2*. I risultati ottenuti indicano che i bersagli di *HLXB9* sono differenti nelle diverse tipologie cellulari in esame, presumibilmente dipendenti dalla quantità di trascritto/proteina presente nella cellula e/o dalla particolare organizzazione della cromatina nelle cellule in cui *HLXB9* è espresso.

In alternativa, si può ipotizzare che il prodotto di *HLXB9* abbia bisogno di altri fattori, per espletare la sua funzione, non sempre presenti nelle cellule.

La regione cromosomica 7q36 è abbastanza conservata durante l'evoluzione dei Primati, infatti in molti Primati non umani la banda cromosomica in cui è localizzato *HLXB9* è quasi sempre in posizione telomerica, indicando anche una possibile conservazione nella distribuzione intranucleare dei geni che vi sono localizzati. L'analisi della posizione intranucleare del gene *HLXB9* in diversi Primati in cui la regione cromosomica contenente *HLXB9* è in posizione telomerica, ha chiaramente dimostrato che nel nucleo interfase, in tutti i casi analizzati, la posizione intranucleare è sempre periferica indicando, in modo indiretto, una conservazione evolutiva della funzionalità del gene *HLXB9*.

1. Introduzione

1.1 Il nucleo e i territori cromosomici

Il nucleo è un compartimento cellulare complesso e dinamico, sede di numerose attività biosintetiche come la replicazione e la riparazione del DNA, la trascrizione e la modificazione di DNA e RNA. Le proteine che controllano i processi nucleari sono altamente organizzate in corpi distinti all'interno del nucleo, organelli ricchi in specifiche proteine e RNAs. Sono stati identificati diversi tipi di corpi nucleari coinvolti in attività quali la regolazione, il processamento di diversi tipi di RNAs, la proteolisi, e la replicazione del DNA (Mao et al., 2011b). Inoltre è di notevole interesse fra i compartimenti nucleari il nucleolo, sede della sintesi dell'RNA ribosomiale e della biogenesi dei ribosomi. Recentemente sono stati messi in luce i diversi ruoli che i nucleoli giocano all'interno della cellula, includendo la regolazione del ciclo cellulare, la morte cellulare e la risposta a diverse tipologie di stress (Shaw et al., 2012).

Il nucleo è ben separato dall'ambiente cellulare circostante grazie alla membrana nucleare, un doppio strato fosfolipidico in cui i due strati sono separati da uno spazio perinucleare di 10-50 nm. La membrana nucleare non solo isola il nucleo dal citoplasma circostante, ma protegge l'integrità del materiale genetico in esso contenuto; possiede, inoltre, diverse proteine trans-membrana, proteine specifiche dello strato esterno che la mettono in comunicazione con il reticolo endoplasmatico e proteine specifiche sul lato interno che comunicano con la matrice nucleare. La matrice nucleare è composta da lamine e altre proteine che forniscono struttura e supporto al nucleo e il corretto ancoraggio e posizionamento per il DNA, i pori nucleari, il nucleolo e le altre proteine nucleari (Rynearson et al., 2011). La matrice cellulare è stato visto essere specifica in base al tipo cellulare considerato e inoltre subisce dei cambiamenti importanti fra cellule normali e cellule tumorali (Lever et al., 2010)

Organizzazione della cromatina nel nucleo interfase

L'architettura e il corretto funzionamento nucleare sono fortemente influenzati dall'organizzazione e dal posizionamento spaziale della cromatina, nonché dalle caratteristiche epigenetiche e strutturali della cromatina stessa. La cromatina delle cellule

eucariotiche ha un'organizzazione tridimensionale all'interno del nucleo. I cromosomi, visibili durante la mitosi, occupano, durante l'interfase, regioni distinte nel nucleo, come suggerito per la prima volta da Carl Rabl nel 1885 e successivamente da Theodor Boveri nel 1909 che coniò il termine di "territorio cromosomico". Dal 1885 fino ad oggi, è stato notevole l'interesse scientifico che ha avuto come obiettivo lo studio della compartimentalizzazione nucleare e l'organizzazione dei territori cromosomici in interfase.

Nel 1993 venne proposto da Litcher e colleghi il modello dei domini intercromosomici (ICD) che vede la presenza di spazi non occupati da cromatina che circondano ogni territorio cromosomico. I geni trascrizionalmente attivi si troverebbero localizzati sulla superficie dei territori cromosomici, venendo così in contatto con i fattori di trascrizione e di splicing. Inoltre, i trascritti di RNA verrebbero rilasciati direttamente a livello dei domini intercromosomici per poi essere trasportati verso i pori nucleari. Il modello ICD, sostenuto in parte da Cremer, fu successivamente modificato con quello che prende il nome di modello dei compartimenti intercromatinici (IC). Tale modello afferma che i domini intercromatinici si estendono, come dei canali, dai pori nucleari tra i territori cromosomici e a volte sono presenti anche tra domini di cromatina compatta all'interno degli stessi territori e non solo sulla superficie esterna del dominio cromosomico (Cremer & Cremer, 2001). Quindi i geni trascrizionalmente attivi possono trovarsi non solo sulla superficie dei territori cromosomici ma anche all'interno, sulla superficie dei subdomini di cromatina condensata intervallati dai compartimenti intercromatinici.

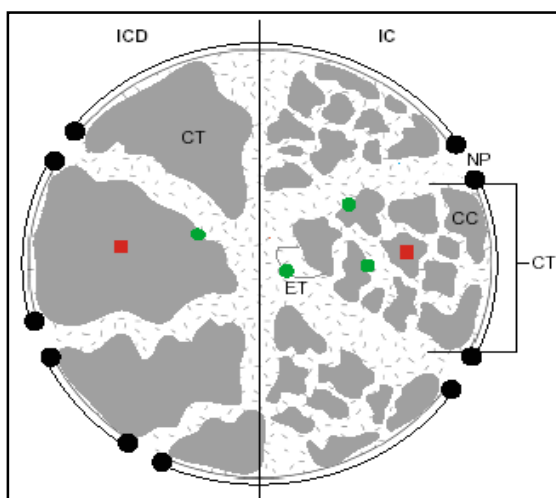


Fig. 1: Confronto tra il modello dei domini intercromosomici (ICD) e il modello dei domini intercromatinici (IC). I cerchi verdi indicano la posizione dei geni trascrizionalmente attivi mentre i quadrati rossi quella dei geni silenti (da Williams et al., 2003).

Oggi è ormai chiaro che i territori cromosomici non sono organizzati casualmente nel nucleo e che è possibile individuare un loro specifico pattern di distribuzione, un pattern radiale. I cromosomi risultano opportunamente posizionati nella parte più periferica o nella parte più interna del nucleo in correlazione con la loro densità genica. Una delle prime evidenze riguardo una distribuzione radiale e non casuale dei cromosomi deriva da uno studio sui cromosomi 18 e 19, appartenenti al gruppo E ed F rispettivamente. Questi, pur presentando la medesima taglia, differiscono per il contenuto genico essendo il 18 il cromosoma più povero in geni e il 19 il cromosoma con la più alta densità genica. È stato messo in evidenza, mediante esperimenti di 3D FISH, che il territorio cromosomico del 19 è localizzato in una porzione interna del nucleo di linfociti umani, mentre il cromosoma 18 si trova localizzato alla periferia nucleare (Croft et al., 1999). È stato visto inoltre che cellule linfoblastoidi di vari primati mostrano anch'essi una distribuzione radiale non casuale: segmenti ortologhi del cromosoma 19 umano sono infatti posizionati più internamente nel nucleo mentre segmenti ortologhi corrispondenti al cromosoma 18 umano si trovano localizzati in periferia (Tanabe et al., 2002).

Quindi il materiale genetico dei cromosomi nel nucleo è distribuito in accordo alla sua ricchezza in geni, ma un ulteriore fattore determinante la distribuzione è la composizione nucleotidica, cioè il contenuto in GC. Il DNA più povero in GC è localizzato più perifericamente rispetto al DNA più ricco in GC. Questo tipo di distribuzione del DNA definisce due compartimenti nucleari aventi differenti livelli di GC oltre a differenti proprietà strutturali e funzionali. Infatti, il DNA ad alto contenuto in GC è dotato di una più alta densità genica, di una replicazione precoce durante la fase S del ciclo cellulare e una struttura più aperta della cromatina; il DNA a basso contenuto in GC ha invece caratteristiche opposte.

La posizione più periferica dei cromosomi poveri in geni e in più con una struttura molto compatta indica che tale area nucleare sia trascrizionalmente silente e al contrario, la posizione più interna nel nucleo dei cromosomi ricchi in geni, con la cromatina decondensata, indica che questa sia una regione trascrizionalmente attiva (Federico et al, 2006). La scoperta che piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNPs) coinvolte nello splicing del pre-mRNA si trovino fuori dai territori cromosomici e che trascritti di RNA

siano localizzati sulla superficie dei territori cromosomici indica che il macchinario trascrizionale e di maturazione del trascritto debba trovarsi fra i territori, nei domini intercromatinici, che sono a contatto con regioni in cui la cromatina è decondensata. Al contrario, la cromatina all'interno dei territori cromosomici è estremamente compattata, risultando inaccessibile ai fattori trascrizionali.

Lo studio di Croft relativo ai cromosomi 18 e 19 è stato poi esteso a tutti i cromosomi nei linfociti umani e nei fibroblasti dermali e la maggior parte dei cromosomi rispecchiano il posizionamento nel nucleo legato alla densità genica, seppure i risultati non sono chiari ed evidenti come per il cromosoma 18 e 19.

Questo perchè i cromosomi sono molto eterogenei sia in taglia ma soprattutto in composizione potendo contenere sia regioni ad alta densità genica che regioni povere in geni. Le regioni cromosomiche ricche in GC sono chiamate bande H3+ mentre le più povere sono le L1+, basandosi sulle isocore che esse contengono (Saccone et al., 1992; Federico et al., 2000). In generale le bande H3+ e le L1+ non sono contigue lungo i cromosomi in metafase e sono separate da bande composizionalmente intermedie, le H3- e le L1-. Inoltre, oltre a mostrare una diversa localizzazione cromosomica, mostrano anche una diversa localizzazione nei nuclei interfasic: le bande H3+ si distribuiscono nella porzione più interna del nucleo e le bande L1+ in quella più periferica. Dunque, un'altra caratteristica delle bande H3+ e L1+ riguarda lo stato di compattezza della cromatina. Ne segue che le bande L1+ hanno una struttura della cromatina compatta, mentre le bande H3+ si mostrano più despiralizzate nel nucleo interfaseico (Saccone et al., 2002).

Con queste conoscenze risulta chiaro il perché della distribuzione dei cromosomi 18 e 19 proposta da Croft: il cromosoma 18 presenta bande L1+ e intermedie, ma non bande H3+, e dunque mostra una localizzazione nucleare periferica; il cromosoma 19 è invece formato da bande H3+ e intermedie, ma non da bande L1+, e dunque mostra una localizzazione interna nel nucleo.

Data la diversa localizzazione nucleare delle bande cromosomiche ogni cromosoma può contribuire al posizionamento del DNA sia al centro del nucleo che alla periferia di esso. Molti cromosomi, infatti, soprattutto quelli di grandi dimensioni, diffondono dalla

periferia del nucleo al centro, supportando l'idea di una polarità composizionale dei cromosomi interfasci.

L'organizzazione cromatinica del cromosoma 7, un cromosoma molto eterogeneo, è stata studiata in dettaglio nei nuclei di linfociti umani. Benchè il suo territorio cromosomico è stato dimostrato essere uno dei più periferici nei nuclei umani (Boyle et al., 2001), esso contiene regioni ricche in GC in corrispondenza di bande H3+ a livello della regione 7p22.3 e 7q22.1. In uno studio del 2008 condotto da Federico e suoi collaboratori sono state usate un pool di sonde BAC per le diverse bande del cromosoma 7 al fine di definire la localizzazione radiale delle differenti regioni lungo il cromosoma. La maggior parte dei loci studiati, 16 su 19, mostrano una localizzazione alla periferia nucleare ma sonde dei loci corrispondenti alle bande 7p22.3 e 7q22.1 si sono localizzate in una posizione più interna al nucleo protrudendo fuori dal territorio cromosomico del 7. Secondo questo studio il cromosoma 7 nei nuclei di linfociti in interfase sarebbe quindi organizzato a zig-zag con le regioni più povere in geni localizzate più vicine all'involucro nucleare e le regioni più ricche in geni localizzate più internamente con le bande 7p22.3 e 7q22.1, ad alta densità genica, che addirittura formano un loop che li estenderebbe fuori dal territorio cromosomico (Fig. 2) (Federico et al., 2008).

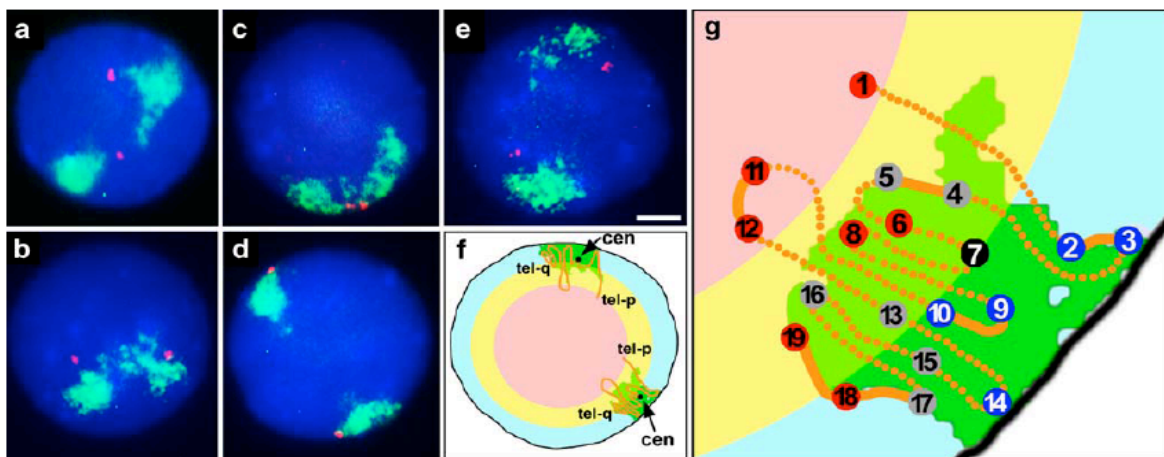


Fig. 2: Organizzazione nucleare a "zig-zag" del cromosoma 7. a–e) Ibridazione *in situ* dual colour del cromosoma 7 (chromosome painting) e alcune sonde puntiformi localizzate su bande diverse del cromosoma; f) Immagine che mostra un nucleo con la rappresentazione del cromosoma 7 e una sua possibile conformazione a zig-zag. g) Ingrandimento di f con l'indicazione della posizione più probabile dei loci analizzati nello studio. I diversi colori dei puntini indicano i loci appartenenti alle bande H3⁺ (in rosso), alle bande L1⁺ (in blu) e alle bande con composizione intermedia (in grigio). Il cerchio in nero (sonda 7) indica la regione centromerica (da Federico et al., 2008).

Assumendo che la localizzazione nucleare sia un parametro che rimane invariato per le regioni e sub regioni cromosomiche è normale aspettarsi che un'alterazione epigenetica della struttura della cromatina correlata ad un riposizionamento genico a livello nucleare possa avere un ruolo nell'istaurarsi di una patologia. Un'alterazione della posizione radiale di un locus specifico nei nuclei in interfase, ad esempio come conseguenza di un riarrangiamento cromosomico può, infatti, condurre ad una malattia genetica a causa di un effetto di posizione.

Cambiamenti dell'organizzazione nucleare in cellule tumorali

Le alterazioni genetiche, mutazioni e riarrangiamenti cromosomici che si riscontrano nelle cellule tumorali, sono cruciali nell'alterare l'espressione genica o la funzione di un gene stesso. I riarrangiamenti più comuni sono le traslocazioni, le duplicazioni e le delezioni. In genere le traslocazioni generano una fusione genica con un oncogene, le duplicazioni generano copie in sovrannumero dei geni mentre le delezioni possono rimuovere geni onco-soppressori o possono anche generare fusioni geniche.

Secondo Grasser e suoi collaboratori, inoltre, le inversioni influenzano maggiormente, rispetto alle traslocazioni, la topologia nucleare. Questa ipotesi è scaturita dallo studio dell'organizzazione nucleare di alcune regioni cromosomiche in cellule umane, in cellule di alcuni primati e in cellule tumorali con vari riarrangiamenti cromosomici (Grasser et al., 2008).

Diversi sono i cambiamenti dell'organizzazione nucleare che hanno un ruolo nella regolazione dell'attività genomica e nell'instaurarsi di una patologia neoplastica. Cambiamenti della forma e della taglia del nucleo, della matrice nucleare e del numero di nucleoli sono caratteristiche utilizzate per distinguere, a livello citologico, le cellule tumorali dalla loro controparte normale. Per esempio cellule cancerose tiroidee e cellule di alcuni tumori ovarici mostrano nuclei con scanalature e fessure e ancora cellule di adenocarcinoma mostrano lobi, rientranze e ripiegamenti nel nucleo che suggeriscono un incremento della de-regolazione e una possibile perdita dei meccanismi di controllo. Sono stati notati inoltre, sui nucleoli, cambiamenti a livello dei siti di sintesi e processamento dell'RNA ribosomiale nonché cambiamenti delle loro dimensioni. Altre alterazioni a livello

dei nucleoli riguardano la formazione di un compartimento perinucleare che forma strette trabecole con la superficie nucleolare: è presente solo nelle cellule cancerose e in alcuni casi è correlato alla progressione maligna della malattia (Lever et al., 2010).

Diversi studi evidenziano che l'organizzazione radiale della cromatina e dei geni può essere alterata nelle cellule cancerose. Per esempio in molti tumori gli oncogeni sono localizzati a livello nucleare in una posizione interna piuttosto che alla periferia nucleare come avviene nei controlli normali (Bartova et al, 2000).

Inoltre i cromosomi 18 e 19, molto studiati per la loro posizione nucleare, rispettivamente periferica e interna, mostrano cambiamenti di localizzazione intranucleare nelle cellule tumorali. Uno studio di Cremer del 2003 confronta i dati relativi alla localizzazione nucleare del cromosoma 18 e 19 di nuclei di linfociti normali e di cellule tumorali. Lo studio dimostra che un'alta frazione di nuclei delle cellule cancerose possiede una localizzazione dei territori cromosomici del 18 e del 19 invertiti, con il territorio del 19 più periferico di quello del 18 (Cremer et al., 2003).

Nelle cellule tumorali si assiste quindi ad una diminuzione della correlazione fra la densità genica e l'organizzazione nucleare. Il meccanismo che conduce a questa diminuzione e ai cambiamenti nel pattern eterocromatinico sono però ancora da chiarire. Questi cambiamenti potrebbero essere conseguenza o causa di un'alterata espressione genica associata alla metilazione della cromatina e all'acetilazione degli istoni. Di conseguenza una descrizione dell'architettura nucleare delle cellule normali e delle cellule maligne è importante per esplorare l'impatto che l'organizzazione cromatinica ha sull'espressione e sul silenziamento genico attraverso meccanismi epigenetici.

Organizzazione della cromatina durante il differenziamento

È noto che durante il differenziamento avvengono drammatiche alterazioni nella morfologia nucleare e la formazione di tipologie diverse di cellule differenziate a partire da precursori indifferenziati è basata su uno switch coordinato dell'espressione genica nei nuclei in interfase. Molti studi hanno suggerito che l'arrangiamento della cromatina nei nuclei ha una relazione non solo con lo stato funzionale del nucleo, ma anche con le funzioni cellulari come la progressione del ciclo cellulare e il differenziamento. Inoltre la

distanza fra i geni e i centromeri gioca un ruolo importante nella regolazione dell'attività genica specifica nelle cellule in differenziamento (Cockell and Grasser, 1999).

Vi sono in letteratura diversi esempi di rimodellamento della cromatina e riposizionamento nucleare associati a diverse tipologie di cellule differenziate comparate con quelle indifferenziate. Nella differenziazione degli adipociti, per esempio, è stato osservato un riposizionamento radiale dei territori cromosomici del 12 e del 16 che è collegato ad una specifica traslocazione t(12;16) associata al liposarcoma. Questi due territori cromosomici vengono a trovarsi vicini durante il differenziamento degli adipociti, condizione che non è stata osservata nei preadipociti (Kuroda et al., 2004).

Durante il differenziamento delle cellule staminali embrionali alcuni geni modificano la loro localizzazione nucleare. Sono state studiate le differenze di condensazione della cromatina fra cellule staminali embrionali pluripotenti e quelle differenziate con acido retinoico. Sono stati investigati i pattern nucleari del gene *Oct4* (6p21.33) responsabile della pluripotenza delle cellule, del gene *C-MYC* (8q24.21) che controlla la progressione del ciclo cellulare e della proteina HP1 (heterochromatin protein 1). Diversamente dalle cellule staminali differenziate, quelle pluripotenti sono caratterizzate da alti livelli di decondensazione dei territori del cromosoma 6 e del cromosoma 8. Inoltre il gene *Oct4* è localizzato su un loop di cromatina che si estende fuori dal territorio cromosomico solo nei nuclei delle cellule pluripotenti. Gli alti livelli di decondensazione della cromatina nelle cellule pluripotenti influenzano, inoltre, la distribuzione di tutte le varianti della proteina HP1. Tutto ciò non si verifica nelle cellule differenziate che sono caratterizzate da differenti arrangiamenti nucleari per le strutture menzionate (Bàrtovà et al., 2008).

Ancora, i loci delle IgH e delle IgK si spostano dalla loro posizione periferica nei precursori delle cellule ematopoietiche, dove sono inattivi, ad una posizione più interna durante la differenziazione in cellule pro-B (Skok et al., 2001). In modo simile il locus della globina assume una posizione più interna nel nucleo durante l'attivazione nel differenziamento degli eritrociti, e i loci CD4 e CD8 modificano la loro posizione radiale durante il differenziamento delle cellule T (Kosak et al., 2002; Kim et al., 2004; Ragozcy et al., 2006).

Alcuni esperimenti hanno dimostrato uno specifico arrangiamento nucleare e territoriale dei geni attivi comparati con quelli inattivi. I geni espressi monoallelicamente rappresentano un modello ideale per saggiare la relazione fra l'attività genica e la posizione nucleare. L'espressione monoallelica, oltre il caso dell'imprinting e dell'inattivazione del cromosoma X, è stata osservata recentemente in numerosi geni, particolarmente in quelli coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento. Per esempio, Takizawa e suoi collaboratori nel 2008 mostrarono che i due alleli di un marker specifico degli astrociti, *GFAP*, che è espresso monoallelicamente, occupano una diversa posizione radiale all'interno del nucleo dopo il differenziamento cellulare. Prendendo nel complesso la popolazione degli alleli attivi e inattivi si nota una localizzazione più interna al nucleo negli astrociti differenziati comparati con quelli non differenziati. Inoltre con metodiche di RNA/DNA FISH è stato evidenziato come sia proprio l'allele attivo ad avere una localizzazione più interna nel nucleo (Takizawa et al., 2008).

Un altro esempio riguarda la localizzazione nucleare del gene *Mash1*, localizzato alla periferia nucleare nelle cellule staminali embrionali. Dopo l'induzione del differenziamento neurale il gene *Mash1* è up-regolato e si riposiziona all'interno del nucleo (Williams et al., 2006).

I cambiamenti nucleari che avvengono durante il differenziamento sono stati evidenziati sia in vitro, mediante modelli cellulari di differenziamento, sia in vivo sfruttando lo sviluppo embrionale di topo, ricerca effettuata recentemente da Patel e suoi collaboratori. Le loro scoperte dimostrano che la regolazione dell'organizzazione della cromatina durante il differenziamento embrionale in vivo può essere paragonata ad un macchinario che promuove la trascrizione e inoltre identificano il fattore FGF (fibroblast growth factor) come un segnale che media la compattazione cromatinica e l'organizzazione nucleare di alcuni geni in studio (Patel et al., 2013).

Come mostrato, sono molti le ricerche che mettono in evidenza quanto il processo di differenziamento sia coordinato da segnali estrinseci che regolano l'espressione di fattori di trascrizione e che determinano poi il destino delle cellule; questo include cambiamenti nella compattazione della cromatina e nella posizione nucleare dei loci genici.

1.2 Neoplasie ematologiche

Le cellule tumorali vengono descritte con alcune caratteristiche classiche, quali il potenziale replicativo illimitato, la mancanza di apoptosi, l'invasione dei tessuti e la formazione di metastasi, la capacità di replicazione indipendente dalla presenza di fattori di crescita ed una marcata angiogenesi. Queste caratteristiche sono le conseguenze di aberrazioni genetiche ed epigenetiche che portano ad una de-regolazione del normale ciclo cellulare.

Si parla di tumori ematici quando le cellule maligne proliferanti originano dal tessuto ematico. La diagnosi e la classificazione delle neoplasie ematologiche è stata proposta nel 2001 e rivisitata nel 2008 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Questo sistema di classificazione è basato sull'utilizzo di dati clinici e di laboratorio derivati da svariate metodologie, includendo l'analisi morfologica delle cellule, la citometria, l'immunostochimica e la genetica molecolare. In particolar modo la dimostrazione della presenza di ricorrenti anomalie genetiche è ormai fondamentale per la diagnosi delle patologie ematopoietiche e anche per stabilire il target terapeutico. Inoltre l'analisi citogenetica delle neoplasie ematologiche ha un ruolo importante per monitorare le recidive dopo la terapia. Sono state definite dalla WHO dodici categorie di tumori del tessuto ematopoietico e linfatico schematizzati in tabella 1.

Tabella 1: Classificazione delle neoplasie ematologiche secondo la WHO

Neoplasie mieloproliferative	Neoplasia dei precursori linfoidi
Neoplasia linfoide e mieloide con eosinofilia e anormalità dei geni <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> o <i>FGFR1</i>	Neoplasia delle cellule B mature
Neoplasia mielodisplasica/mieloproliferativa	Neoplasia delle cellule T e NK mature
Sindrome mielodisplasica	Linfoma di Hodgkin
Leucemia mieloide acuta con correlata neoplasia dei precursori	Disordini linfoproliferativi associati ad immunodeficienza
Leucemia acuta di origine ambigua	Neoplasia delle cellule istiocitiche e dendritiche

Neoplasie delle linee cellulari mieloidi

La classificazione WHO include nel termine “mieloide” tutte le cellule derivanti dalle linee granulocitica (neutrofili, basofili, eosinofili), monocitico/macrofagica, eritrocitica, megacariocitica e cellule mastocitarie.

Le neoplasie della linea mieloide comprendono sia forme in cui si hanno essenzialmente blasti con minima o nessuna maturazione come la leucemia mieloide acuta (AML), sia forme in cui si hanno cellule in maturazione. Queste ultime si differenziano ulteriormente a seconda che ci si trovi in presenza di maturazione efficace (sindromi mieloproliferive), maturazione inefficace associata a displasia (sindromi mielodisplastiche) o ancora associazione di maturazione efficace e inefficace (sindromi mielodisplastiche /mieloproliferative) (Vardiman et al., 2010).

Una caratteristica importante per classificare le neoplasie mieloidi e stimare la loro evoluzione è la valutazione della percentuale di blasti presenti nei campioni di sangue periferico e midollare. La WHO raccomanda che tale percentuale debba essere calcolata, quando possibile, da una conta di almeno 200 leucociti in uno striscio di sangue periferico e 500 cellule nucleate in uno striscio proveniente da aspirato midollare, colorati con Wright-Giemsa.

Una percentuale di blasti pari o superiore al 20% è considerata caratterizzante di una leucemia mieloide acuta (AML) de novo, di un’evoluzione in leucemia acuta quando si riscontra in pazienti con precedente diagnosi di sindrome mielodisplastica o mielodisplastica/mieloproliferativa o ancora di trasformazione blastica in una precedente diagnosi di sindrome mieloproliferativa (Vadirman et al., 2009). Di per se il valore soglia del 20% di blasti non è una indicazione a trattare il paziente come se si fosse in presenza di AML o di trasformazione blastica. La terapia deve, infatti, tener conto della valutazione clinica e di tutti i parametri clinici disponibili.

Leucemia mieloide acuta

La leucemia mieloide acuta (AML) è una neoplasia eterogenea, a eziologia ancora largamente sconosciuta, che insorge ad ogni età con una frequenza maggiore fra i 60 e i 65 anni. Deriva dalla trasformazione maligna di cellule ematopoietiche immature

condotte alla proliferazione e dall'accumulo prima nel midollo, poi nel sangue periferico e poi in altri organi e tessuti, di cellule progenitrici mieloidi che non differenziano normalmente. L'insufficiente e difettiva produzione di cellule ematiche mature si manifesta con una sintomatologia clinica specifica: anemia generata dalla mancanza di eritrociti, manifestazioni emorragiche determinate dalla mancanza di piastrine e infezioni generate da granulocitopenia (Tura, 2003).

Per effettuare la diagnosi di AML viene esaminato il sangue periferico e l'aspirato midollare. Talvolta può essere necessario il prelievo di un frammento osseo se l'aspirato è troppo diluito, con poche cellule o inaspirabile. L'analisi citogenetica classica è fondamentale per la diagnosi e inoltre fornisce informazioni utili alla prognosi. Sulla base dei risultati ottenuti sul cariotipo iniziale e del sospetto diagnostico, fondato su dati clinici, morfologici e immunofenotipici, possono essere richiesti ulteriori studi genetici quali FISH (Ibridazione In Situ Fluorescente) e/o RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction). Occasionalmente si può ricorrere alla diagnosi molecolare delle mutazioni che talvolta colpiscono specifici geni come *NPM1*, *CEBPA*, *KIT* o *FLT3* (Döhner et al, 2010).

Secondo la classificazione WHO, le leucemie mieloidi acute sono divise in 3 sottogruppi:

- AML con anomalie citogenetiche ricorrenti [t(8;21), inv(16), t(15;17), t(9;11), t(6;9), inv(3) ecc]
- AML con anomalie mielo-displasiche correlate
- Neoplasie mieloidi terapia-correlate.

La citogenetica rimane il più importante fattore prognostico malattia-correlato e consente di identificare le seguenti categorie di rischio:

- Basso rischio, caratterizzate da t(8,21)(q22;q22), inv(16)/t(16;16)(p13;q22), t(15;17)(q22;q11-q12), mutazioni del gene *NPM1* o *CEBPA* in pazienti con citogenetica normale in assenza di *FLT3-ITD*;
- Rischio intermedio: rappresentano il gruppo con il più ampio numero di pazienti e maggiormente eterogeneo. Reperti frequenti sono: citogenetica normale, trisomia

- 8 (+8), t(9;11)(q22;q23), t(3;5)(q25;q34) e, dal punto di vista molecolare, mutazioni di *NPM1* o *CEBPA* in pazienti con cariotipo normale in assenza di *FLT3-ITD*;
- Alto rischio in cui si può riscontrare cariotipo complesso con numero di anomalie maggiore di 3, -5/5q-, 7/7q-, anomalie 11q23 (MLL) diverse da t(9;11)(q22;qq23), inv(3;3)(q21q26.2), t(6;9), t(9;22), anomalie (17p).

La continua scoperta di nuovi fattori prognostici e l'utilizzo di linee cellulari leucemiche in vitro ha consentito una migliore comprensione della biologia di questa malattia e lo sviluppo di nuovi targets terapeutici. Nonostante l'uso di chemioterapici e il trapianto di cellule staminali, però, la guarigione da questa patologia è ancora difficoltosa.

La linea cellulare leucemica GDM-1

La possibilità di avere a disposizione linee cellulari mielo-monocitiche che rappresentano la proliferazione in vitro di cellule leucemiche di origine non linfoide è di grande utilità per investigare le leucemie umane e l'alterata differenziazione cellulare che caratterizza tali patologie. Queste cellule possono essere usate per valutare in vitro l'azione citotossica di nuovi agenti farmacologici o sostanze che possono essere usate nel trattamento delle leucemie mieloidi umane. Diverse linee cellulari furono stabilite da pazienti affetti da leucemia mieloide acuta. La prima linea cellulare mieloide, la K562, fu stabilita nel 1975 dal fluido pleurale di un paziente con una leucemia granulocitica cronica, cromosoma Philadelphia positivo, in crisi blastica. Seguì la linea HL-60 proveniente da una donna con leucemia promielocitica acuta e la KG-1 stabilita dal midollo osseo di un paziente con eritroleucemia.

La linea cellulare permanente GDM-1 deriva dal sangue periferico di una paziente con un disordine mieloproliferativo, cromosoma Philadelphia negativo, dopo trasformazione ad una leucemia mieloblastica acuta. La paziente era una donna di 65 anni ospedalizzata nell'Agosto del 1978 per affaticamento e infezioni gengivali. L'esame fisico rivelò una marcata splenomegalia mentre gli esami di laboratorio rivelarono un valore di emoglobina di 7,2 g%, $2,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ globuli bianchi e 40.000 piastrine. L'esame del midollo osseo era compatibile con la diagnosi di leucemia granulocitica cronica,

mostrando una marcata iperplasia delle cellule della serie granulocitica e un incremento del numero di precursori mieloidi. Il cromosoma Philadelphia non era presente nelle cellule ottenute da sangue periferico e da midollo. Fu così stabilita la diagnosi di disordine mielo-proliferativo cromosoma Philadelphia negativo.

Durante i sei mesi successivi la paziente fu sottoposta a cure farmacologiche senza, però, ottenere miglioramenti significativi. Furono aggiunte al regime farmacologico delle irradiazioni alla milza che diedero qualche decremento nella misura di quest'organo. Un anno dopo, nel Giugno 1979, la paziente fu ospedalizzata nuovamente con un marcato incremento nella conta dei globuli bianchi che arrivarono $50.000/\text{mm}^3$ con il 40% di blasti. L'esame del midollo osseo confermò la diagnosi di trasformazione ad una leucemia mielo-monoblastica acuta. Fu continuato il trattamento farmacologico ma la conta dei globuli bianchi arrivò a $100.000/\text{mm}^3$ e si sviluppò una grave epato-splenomegalia e un grave ittero. Malgrado la combinazione aggressiva di chemioterapici la paziente non rispose clinicamente e morì con marcato ittero e sepsi.

Le cellule della linea GDM-1 crescono singole in sospensione in RPMI 1640 addizionato del 20% di FBS (Fetal bovin serum) e 1% di P/S (Penicillin/Streptomycin), a 37°C con il 5% di CO_2 e il loro tempo di duplicazione è di 96-120 ore. Le cellule appaiono relativamente omogenee in taglia, sferiche, con diametro che varia da $15\ \mu\text{m}$ a $20\ \mu\text{m}$, con nuclei frequentemente irregolari contenenti fine cromatina e pochi nucleoli. L'abbondante citoplasma è basofilo e contiene vacuoli. L'apparato di Golgi è ben sviluppato e l'ampio citoplasma contiene mitocondri e corpi densi. Molte cellule mancano di queste caratteristiche e somigliano a blasti immaturi indifferenziati con un alto rapporto nucleo-citoplasma e poco citoplasma. Le cellule della linea GDM-1 sono state esaminate per la loro capacità di ingerire particelle di lattice e di ferro. Dopo 2 ore di incubazione con il lattice, l'attività fagocitica è ancora bassa e la maggior parte delle cellule contiene poche particelle, ma dopo 24 ore di incubazione le cellule sono cariche di lattice. Per quanto riguarda invece la fagocitosi delle particelle di ferro, i risultati mostrano che approssimativamente il 50% delle cellule sono capaci di ingerirlo dopo 2 ore, mentre dopo 6 ore le cellule sono completamente riempite e disintegrate (Ben-Bassat et al., 1982).

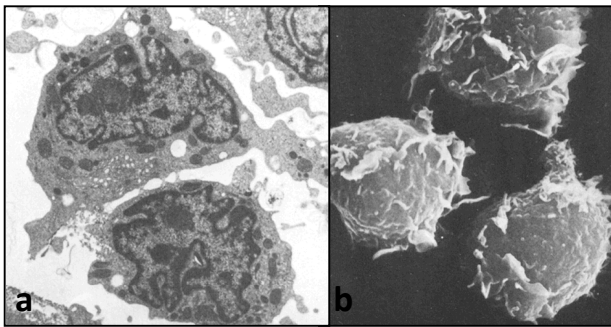


Fig. 3: Linea cellulare GDM-1. a) Cellule leucemiche in coltura con tipici caratteri monocitici: superficie irregolare, ampio citoplasma contenente corpi densi, vescicole e mitocondri, nucleo irregolare con cromatina e nucleoli marginali (x 6600). b) Scansione al microscopio elettronico della coltura cellulare GDM-1 (x 3600) (da Ben-Bassat et al., 1982).

La GDM-1 possiede il recettore 1a e l'antigene M-1 specifico della leucemia mieloide. Il cariotipo della linea cellulare mostra le stesse anomalie cromosomiche presenti nei monoblasti ottenuti dal sangue periferico prima della morte della paziente, indicando che la linea cellulare era derivata dalle originali cellule leucemiche. Infatti, lo studio mediante colorazione con bandeggio G della linea GDM-1 ha prodotto il seguente cariotipo: 48XX, der(2)t(2;11)(q36;q13), t(6;7)(q23;q36), +8, del(12)(p11.2-p12.2), +13, del(16)(q23) che corrisponde a quello riportato per il paziente, 48XX, 6q-, 7q+, +8, del(12)(p11.2-p12.2), +13, del(16)(q23).

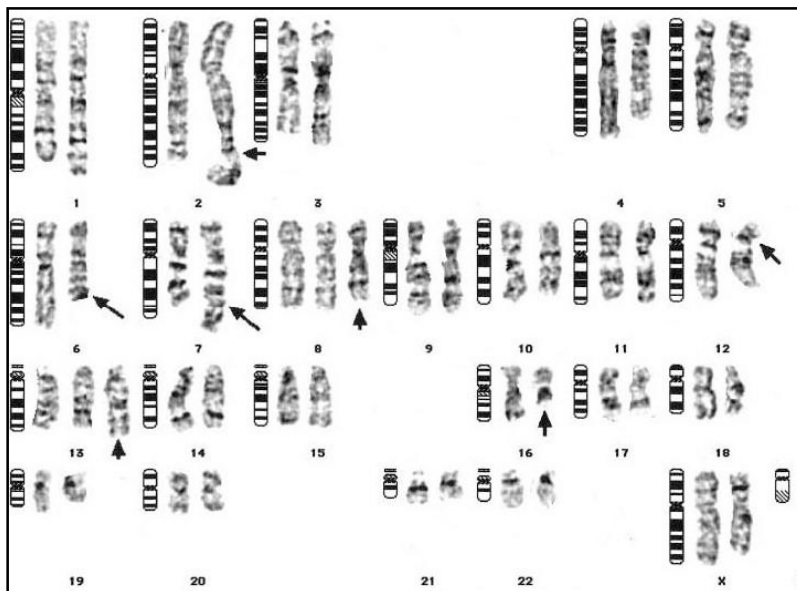


Fig. 4: Cariotipo in bande G della linea cellulare GDM-1. Le frecce indicano i riarrangiamenti cromosomici presenti nella suddetta tipologia cellulare (da Nagel et al., 2005).

L'analisi del cariotipo della GDM-1 rivela quindi due traslocazioni, una delle quali coinvolge i cromosomi 6 e 7 con i seguenti punti di rottura: t(6;7)(q23;q36). La FISH mostra i breakpoint di questa traslocazione vicini alla regione a monte di *HLXB9*, al 7q36, una regione spesso riarrangiata nei pazienti AML, e al 6q23 a monte di *MYB*, un gene attivato in leucemia. Sebbene siano state descritte nei pazienti con leucemia mieloide acuta infantile delle fusioni fra il gene *HLXB9* e *ETV6* attraverso la traslocazione t(7;12)(q36,p13) (Beverloo et al, 2001) e sebbene sia il 7q36 che il 12p13 siano delle regioni riarrangiate nella GDM-1 il trascritto della fusione *HLXB9-ETV6* non è stato riscontrato mediante RT-PCR nella linea cellulare.

Sono stati studiati i geni fiancheggianti i breakpoint della traslocazione 6;7 mediante un'analisi di espressione con RT-PCR. Sono stati scelti i geni *ALDH8A1*, *HBS1L*, *MYB* e *AHI-1* al 6q23 e i geni *C7ORF2*, *C7ORF3*, *HLXB9* e l'ubiquitin-protein isopeptide ligase E3 al 7q36. Il dato più interessante è stato quello del gene *HLXB9* che era espresso solo nella GDM-1 rimanendo silente in altre 19 linee cellulari leucemiche, in 17 linee T-cell e in altre 22 linee ematopoietiche non neoplastiche nonché nelle cellule provenienti da sangue periferico. Sono stati quindi studiati gli effetti di oligonucleotidi antisenso diretti contro *HLXB9* sulle cellule della linea GDM-1 ed è stato visto che la riduzione dell'espressione di *HLXB9* riduce la vitalità cellulare del 10%, percentuale che aumenta fino al 35% in presenza degli esteri del forbolo (Nagel et al, 2005). Sono ancora da chiarire, però, le conseguenze di una espressione ectopica di *HLXB9* nelle cellule ematopoietiche e il suo coinvolgimento nell'istaurarsi delle patologie leucemiche.

Altro gene espresso nella GDM-1 è *MYB*; la funzione di *MYB* è stata studiata intensamente in letteratura: sappiamo infatti che nelle cellule ematopoietiche questo gene influenza vari processi cellulari, come la proliferazione e il differenziamento (Ness, 1996) ed inoltre è stato identificato come secondo target nella leucemia mieloide acuta (Castilla et al., 2004).

Questo ha fatto ipotizzare che *MYB* possa influire sull'overespressione di *HLXB9* nella linea GDM-1 mediante giustapposizione di questo gene con elementi regolatori di un allele di *MYB* attivato proprio dalla traslocazione cromosomica 6;7 che li coinvolge.

Tuttavia rimane ancora da spiegare quale sia il meccanismo che lega *MYB* alla leucemogenesi mediata da *HLXB9*.

1.3 Il cromosoma 6

Caratteristiche citogenetiche, molecolari e implicazioni patologiche

Il cromosoma 6 appartiene al gruppo C insieme ai cromosomi 7, 8, 9, 10, 11, 12 e X. È un cromosoma sub metacentrico con indice centromerico elevato (circa 40) e con un braccio corto che rappresenta circa il 35% della lunghezza totale del cromosoma. Sono state osservate costrizioni secondarie sia sul braccio corto che sul terzo medio del braccio lungo. È composto da quattro regioni cromosomiche, due appartenenti al braccio corto e due al braccio lungo. Un'area di maggiore addensamento cromatinico è talvolta evidenziabile alle estremità telomeriche dei bracci corti. Sono presenti inoltre aree di ipercolorazione elettiva (Ventruto et al., 2001).

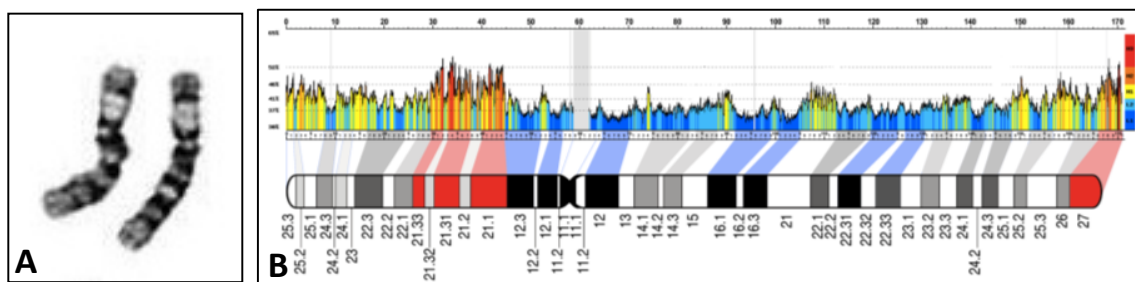


Fig. 5: a) bandeggio G del cromosoma HSA6; b) ideogramma del cromosoma HSA6 con l'indicazione delle bande H3+ (in rosso) e del profilo del livello di GC dell'intero cromosoma. Le regioni rosse del profilo corrispondono a quelle maggiormente ricche in GC, viceversa per le regioni in azzurro.

Il cromosoma 6 costituisce circa il 6% del genoma umano e la sequenza completa comprende 166.880.988 paia di basi con 1.557 geni e 633 pseudogeni. Sono stati identificati come codificanti almeno il 96% dei geni e tra questi ci sono geni direttamente implicati nel cancro, nella schizofrenia, nell'autoimmunità e in molte altre patologie. Il cromosoma 6 ha acquistato grande notorietà per la presenza del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), una regione di 3,6 megabasi (Mb) sulla banda 6p21.3, il quale svolge un ruolo essenziale nel sistema immunitario innato ed acquisito, ed è caratterizzato da un'elevata densità genica, elevato polimorfismo e alto linkage disequilibrium.

Tra i 2190 geni identificati sono stati osservati:

- 772 geni noti con il 61% associato a isole GpG;
- 287 geni a sequenza ignota, con un open reading frame e una identità ad una ESTs;
- 213 nuovi geni con una ORF ambigua;
- 282 geni putativi con identità ad una ESTs ma non contenenti una ORF;
- 633 pseudogeni, simili alle proteine note, ma contenenti frameshifts e/o codoni di stop che perturbano la ORF.

Ad esclusione degli pseudogeni, il cromosoma 6 presenta densità genica di 9,2 geni per Mb, per cui esso può essere considerato un cromosoma relativamente povero di geni tranne che per la regione relativa al sistema di istocompatibilità dove la densità genica è di 43 geni per Mb. La lunghezza della sequenza occupata dai geni noti includendo gli introni ma escludendo gli pseudogeni è di 70.396.075 bp, cioè il 42,2%. Questa percentuale è paragonabile a quella precedentemente stimata per i cromosomi 7, 14, 20 e 22 (46,5%, 43,6%, 42,4% e 51% rispettivamente).

La sequenza cromosomica occupata dagli esoni è solo del 2,2% con una lunghezza media esonica di 281 bp. L'esone più lungo è di 9114 bp ed appartiene al gene noto *ZNF451*; il gene *BPAG1* è noto invece per possedere il maggior numero di esoni, 101, mentre l'introne più esteso è il primo del gene *TCBA1*, lungo 479 kb. Il gene più esteso è *PARK2* localizzato a livello della banda 6q24; ha 12 esoni, si estende per circa 1.4 Mb ed è mutato in pazienti con esordio giovanile della sindrome di Parkinson. Infine, il numero medio di trascritti annotati per gene è 2,34 (esclusi i geni putativi) e l'oncogene *FYN*, con 16 trascritti annotati, presenta il più elevato numero di trascritti (Mungall et al., 2003).

Le sequenze ripetute sono piuttosto abbondanti nel cromosoma 6, occupando il 43,95%. Nello specifico le LINE, le SINE, gli LTR, i retrotrasposoni e i trasposoni a DNA occupano il 20,85%, l' 11,29%, l' 8,05% e il 3,24% della sequenza, rispettivamente. L'analisi delle ripetizioni ha anche rivelato una struttura inusuale consistente di 17 ripetizioni in tandem, adiacente alle sequenze ripetute Alu all'interno del clone RP11-13J16 nella porzione terminale del braccio lungo (6pter), indicativa di una complessa serie

di duplicazioni. Vi è la crescente evidenza che i cluster di ripetizione Alu siano mediatori di ricorrenti aberrazioni cromosomiche, ed è interessante notare come ci siano una serie di fenotipi patologici che coinvolgono riarrangiamenti cromosomici al 6pter, tra cui il glaucoma, la palatoschisi orofacciale e diverse neoplasie (Kolomietz et al., 2002).

Sono stati evidenziati un totale di 183.019 SNPs sulla sequenza completa del cromosoma 6. Con 86 SNPs per ogni kb il gene *HLA-B* del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I è il più polimorfico del cromosoma 6 e del genoma umano, seguito da altri geni del MHC di classe I e di classe II.

Sono stati riscontrati 130 geni mappati sul cromosoma 6 che sono responsabili, predispongono o addirittura proteggono da malattie. Di questi, 84 (il 65%) sono già stati clonati e includono il gene *HFE29* del complesso MHC di classe I, parecchio studiato perchè mutato nell'emocromatosi ereditaria (Feder et al., 1996).

Il complesso MHC rappresenta una regione di interesse del genoma umano poichè almeno cento malattie sono state collegate ad esso, compresa la maggior parte delle malattie autoimmuni. Le patologie autoimmuni sono disordini molto comuni, complessi e scatenati da fattori ambientali oltre che genetici. Colpiscono il 4% della popolazione e includono patologie come il diabete di tipo 1, l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla.

Sul cromosoma 6 sono presenti anche geni che, quando mutati, determinano patologie al tessuto neurale e sono quindi di particolare interesse nello studio dei disturbi neurologici e psichiatrici. Esempi di questi geni sono:

- il gene *SCA1* che, quando mutato può causare atassia spino-cerebellare;
- il gene *EPM2A*, mutato nei pazienti con epilessia mioclonica di Lafora;
- il gene *PARK2*, in cui mutazioni puntiformi o delezioni sono responsabili di un esordio giovanile del Parkinson.

Altri studi, inoltre, hanno collegato il gene *DTNBP1*, localizzato al 6p22, alla schizofrenia. Questo gene, infatti, codifica per la disbindina, una proteina localizzata nelle terminazioni presinaptiche e coinvolta nella formazione e nel mantenimento delle sinapsi, nonché nei segnali di trasduzione (Schwab et al., 2003).

Infine, la regione 6q26 è stata attentamente esaminata per la presenza di geni tumore-soppressori (TSGs). Mutazioni che inattivano i geni tumore-soppressori spesso comportano cambiamenti su larga scala, come la perdita di grandi frammenti cromosomici contenenti i TSGs. Inoltre, il braccio lungo del cromosoma 6 è stato al centro dell'attenzione per i genetisti del cancro poichè geni presenti in questa regione mostrano rilevanza nella progressione di una serie di tumori solidi ed ematologici.

- 81 segmenti genici dai loci per il recettore di cellule T (TCR);
- 24 segmenti pseudogenici TCR;
- 144 pseudogeni.

Dunque complessivamente sul cromosoma 7 si registrano 1455 potenziali geni codificanti proteine (noti, nuovi, parziali, previsti) e 213 geni putativi e geni non codificanti RNA (Venter et al., 2001). Inoltre dei geni noti, 474 su 863 (55%) hanno mostrato una o più forme di splicing alternativo, paragonabili a quelle osservate sui cromosomi 14 (54%) e 22 (59%).

Sono stati riscontrati 18 geni la cui dimensione è più grande di 500 kb, il più grande, *CNTNAP2*, è di 2300 kb. La banda 7q22 ha mostrato, inoltre, la più alta densità genica.

Se vengono considerati i 1749 geni conosciuti, esclusi gli pseudogeni, si copre un totale di 72,9 Mb di sequenza, il che suggerisce che almeno il 46,5% del cromosoma 7 è trascritto (la distanza media intergenica è di 42,4 kb). Sono state identificate un totale di 1335 isole CpG, delle quali il 63% (541 di 863) risiedono al 5' dei geni noti.

Sono state scoperte, inoltre, 20 regioni eucromatiche ciascuna con dimensioni superiori a 500 kb in cui non è stato trovato alcun gene noto, nuovo, o parziale, denominate “*deserti genici*”. Questi intervalli (16 su 20), localizzati per lo più all'interno o al confine delle bande scure con colorazione Giemsa, coprono 20,5 Mb (13%) del cromosoma 7 e contengono inoltre un basso numero di CpG (0,8/Mb contro 9,8/Mb di controllo) e di SINEs (7,5% contro il 16%) e un'alta densità di LINEs (28,1% contro il 18,8%). Inoltre, l'analisi nel topo delle regioni equivalenti al “deserto genico” dell'uomo, non ha mostrato la presenza di nessun nuovo gene, il che suggerisce che queste 20 regioni eucromatiche siano originate prima della divergenza del genoma umano e del topo (Scherer et al., 2003).

Il cromosoma 7 contiene la maggiore quantità di duplicazioni intracromosomiche: sono stati identificati 146 segmenti distinti, che costituiscono il 5,3% del cromosoma (8,3 su 157,9 Mb). Dupliconi di grandi dimensioni (> 100 kb) sono stati identificati al 7p22, al 7p14-p15, nella regione pericentromerica, al 7q11.21, al 7q11.23, al 7q22 e al 7q36.

Sono state identificate inoltre duplicazioni segmentali contenute in 37 cloni batterici artificiali (BACs): utilizzando la metodica di FISH ad alta risoluzione, è stata scoperta una

duplicazione segmentale telomerica di circa 1 Mb di dimensioni relativa alla regione coinvolta nella sindrome di Williams-Beuren (WBS) (Mural et al., 2002).

Nei pazienti autistici è stato identificato un locus di suscettibilità per tale patologia, il gene *AUTS1* che mappa sul braccio lungo del cromosoma 7 e all'interno della regione 7q22-q31 vi sono i breakpoint di una traslocazione associata a questa patologia (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998). Questi breakpoint sono stati riscontrati in prossimità del gene *FOXP2* che è stato mostrato essere causa di disordine della parola e del linguaggio o in prossimità del gene *NPTX2* che è coinvolto nella genesi delle sinapsi eccitatorie.

Studiando i breakpoint di riarrangiamenti di pazienti con anomalie del cromosoma 7, è stato osservato che alcuni di questi breakpoint si trovano in corrispondenza di loci associati a patologie quali leucemia mieloide acuta, sindrome malformativa cavernosa, linfoma splenico e autismo. In particolar modo la monosomia del cromosoma 7 e le delezioni del braccio lungo sono anomalie cromosomiche frequentemente riscontrate nelle sindromi mielodisplastiche e nella leucemia mieloide acuta. Il breakpoint citogenetico delle delezioni 7q è variabile e tali delezioni possono essere sia terminali che interstiziali. La delezione più comunemente riportata è la del(7)(q22) che implica una delezione terminale con breakpoint sulla banda q22 e la 7q32-q34 (Tosi et al., 1996; 1999).

La monosomia del cromosoma 7 è inoltre osservata in disordini costituzionali come l'anemia di Fanconi o la neutropenia congenita. Altre anomalie citogenetiche del cromosoma 7 sono state trovate in differenti tipi di neoplasie probabilmente poiché il braccio lungo del suddetto cromosoma contiene geni onco-soppressori e oncogeni (Johnson et al., 1997).

Infine, il cromosoma 7 contiene diversi geni importanti per lo sviluppo come *PAX4*, implicato nello sviluppo delle cellule beta pancreatiche, *GBX1* (Gastrulation brain homeobox1) implicato nello sviluppo neurale e *HLXB9*.

1.5 Il gene *HLXB9*

Evoluzione, struttura ed espressione del gene

Il gene *HLXB9* fu isolato per la prima volta nell'uomo nel 1991 e successivamente in altri vertebrati. È un gene marginalmente correlato ai geni homeobox *Hox*, *ParaHox*, *En*, *EMX* e *NK* ma la sua origine e la sua evoluzione non sono ancora del tutto chiariti. Inizialmente alcuni autori affermarono che *HLXB9* fosse correlato o derivasse dal gene omeotico *proboscipedia* presente nella drosofila. Alla luce delle conoscenze attuali, però, questo sembra improbabile poiché *HLXB9* mappa sulla banda 7q36 (vicino ad *En2* e *GBX1*) e non all'interno dei cluster *Hox* umani, localizzati su altre regioni cromosomiche.

Altri autori ritengono che *HLXB9* sia un membro di un'altra classe di geni homeobox, e questo è stato ipotizzato per l'alta percentuale di identità fra *HLXB9* e un gene homeobox riportato nel pollo e denominato *MNR2* (Tanabè 1998). Un aspetto accomuna questi due geni: *MNR2* e *HLXB9* sono entrambi espressi durante il differenziamento dei motoneuroni.

Nel 2001 è stato identificato un cDNA nel cefalocordato *amphioxus* che codifica per una proteina con sequenze fortemente simili alle proteine *HB9* e *MNR2* presenti nei vertebrati. Il corrispettivo gene fu definito *AmphiMnx*.

Analisi filogenetiche molecolari sono state usate per investigare le relazioni fra *HLXB9*, *MNR2* e *AmphiMnx*. Questi studi sembrano indicare che *HLXB9* e *MNR2* sono correlati da una duplicazione genica che ha dato vita a geni ortologhi, e che questa duplicazione precede la divergenza fra anfibi e amnioti. Inoltre il gene *AmphiMnx* divergerebbe prima dell'evento di duplicazione genica. Come conseguenza di queste relazioni evolutive il gene *HLXB9* è stato definito anche *Mnx1* e il gene *MNR2* è stato rinominato *Mnx2*.

Ibridazioni *in situ* sull'embrione di *amphioxus* hanno rivelato che *AmphiMnx* ha un pattern di espressione dinamico nel neuroectoderma e nel mesoderma. La prima presenza del gene è rilevata dopo dieci ore dalla fertilizzazione, lungo la lunghezza della placca neurale sottostante il mesoderma. L'espressione persiste fino alle quindici ore, scomparendo per la maggior parte entro le diciannove ore, ad eccezione dell'estremità

anteriore e posteriore del tubo neurale in cui restano segnali piccoli ed irregolari (Ferrier et al., 2001).

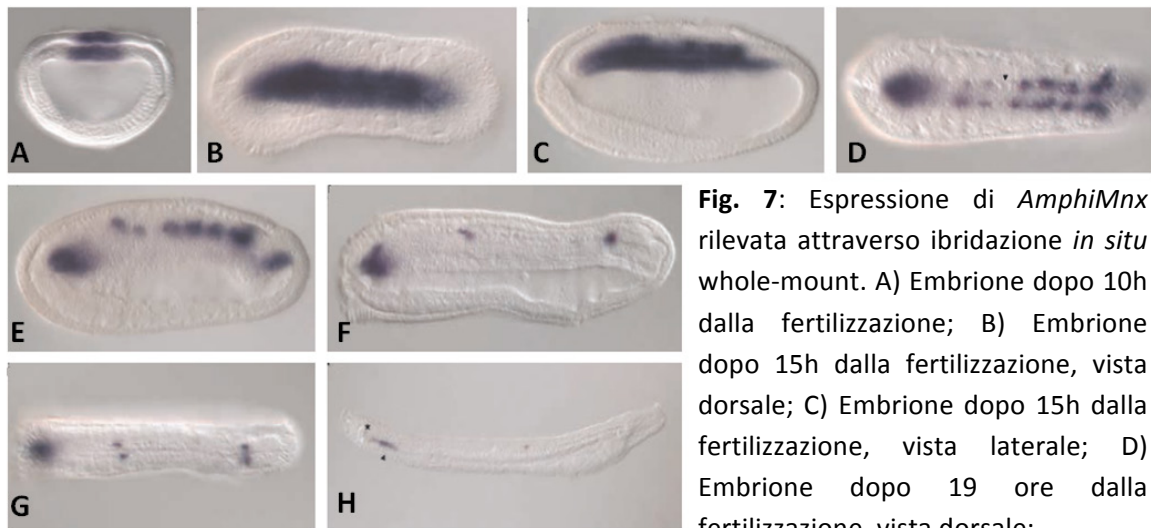


Fig. 7: Espressione di *AmphiMnx* rilevata attraverso ibridazione *in situ* whole-mount. A) Embrione dopo 10h dalla fertilizzazione; B) Embrione dopo 15h dalla fertilizzazione, vista dorsale; C) Embrione dopo 15h dalla fertilizzazione, vista laterale; D) Embrione dopo 19 ore dalla fertilizzazione, vista dorsale;

E) Embrione dopo 19 ore dalla fertilizzazione, vista laterale; F) Embrione dopo 24 ore dalla fertilizzazione, vista laterale; G) Embrione dopo 24 ore dalla fertilizzazione, vista dorsale; H) Larva a 35 ore (modificato da Ferrier et al., 2001).

HLXB9, conosciuto quindi anche come *MNX1* (motor neuron and pancreas homeobox), è localizzato sul cromosoma 7, a livello della banda q36.3 e appartiene alla famiglia *EHG* di geni homeobox che comprende oltre a *HLXB9* anche *EN1*, *EN2*, *GBX1* e *GBX2* (Nagel et al., 2005). I geni homeobox sono regioni altamente conservate nelle singole specie che codificano per specifiche proteine le quali si legano al DNA agendo come fattori di trascrizione con funzioni di attivazione o repressione di altri geni.

HLXB9 è un gene di 12.801 bp, è composto da 3 esoni e codifica per un fattore di trascrizione, HB9, formato da 401 aminoacidi (Wildenhain et al, 2012). *HLXB9* contiene un homeodominio, strutturato in tre eliche, che va dal 242° al 299° aminoacido preceduto da una regione altamente conservata di 82 aminoacidi (159-241) e da una regione di polialanine che si espande dal residuo 121 al residuo 134 nell'esone 1 (Garcia-Barcelò et al., 2009).

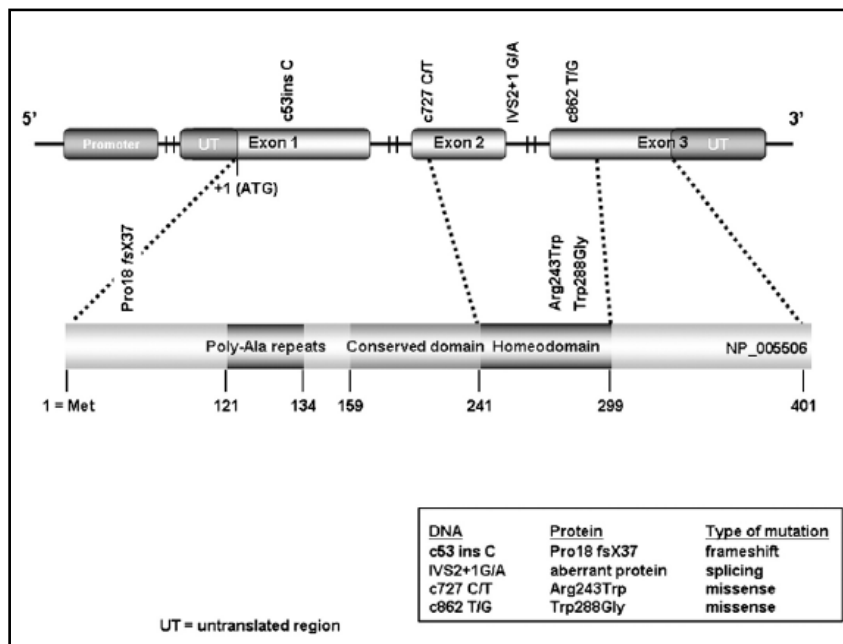


Fig. 8: Struttura del gene HLXB9. In evidenza i tre esoni che formano il gene, la posizione dell'homeodominio, del dominio altamente conservato e della regione di polialanine (da Garcia-Barcelò et al., 2009).

Sebbene all'interno del gene *HLXB9* del topo sia stata individuata una regione di 9 Kb al 5' in grado di condurre l'espressione in vivo dei motoneuroni (Arber et al., 1999), non si conosce molto circa il meccanismo molecolare che organizza la completa regolazione di questo gene. Alcuni studi si sono focalizzati sulla comparazione di sequenze non codificanti all'interno di questa regione che si sono dimostrate altamente conservate comparando genomi di più specie.

Basandosi sullo screening delle omologie delle regioni promotrici di *HLXB9* del topo e dell'uomo è stata individuata una regione enhancer di 3.6 Kb che è in grado di provvedere sufficientemente all'espressione dei motoneuroni. Comparando le sequenze di topo, uomo e pufferfish (*Fugu rubripes*) si è identificata una regione conservata di 438 bp formata da due frammenti non contigui di 313 bp e di 125 bp, proprio all'interno della regione enhancer di 3.6 Kb. Nello zebrafish (*Danio rerio*) è stata trovata una regione che possiede due copie identiche della sequenza di 125 bp mentre non si è riscontrata la sequenza di 313 bp. Studi effettuati mediante l'utilizzo di costrutti transgenici hanno mostrato che la sequenza di 125 bp da sola è in grado di dirigere l'espressione dei motoneuroni spinali, mentre la regione di 313 bp non ha questa attività di enhancer.

Questo ha suggerito che proprio questa sequenza potrebbe avere funzioni nella regolazione e nell'espressione specifica del gene *HLXB9* (Nakano, 2005).

Uno studio del 2012 utilizza lo zebrafish come modello per studiare la regolazione del gene *HLXB9* focalizzandosi su quella specifica delle cellule pancreatiche. Il gene è espresso nello zebrafish e nel topo durante due diverse fasi dello sviluppo del pancreas. Prima della fase embrionale della morfogenesi, *HLXB9* è espresso nell'endoderma pancreatico, ma con la morfogenesi questo gene viene prima down-regolato e successivamente riattivato durante il differenziamento delle cellule beta. I dati suggeriscono che l'espressione specifica tardiva di *HLXB9* nelle cellule beta è associata con la funzione conservata evolutivamente nella differenziazione e nella maturazione delle cellule beta. Questo fa di *HLXB9* un marker precoce e specifico del differenziamento delle cellule pancreatiche e suggerisce che questo gene è collegato agli step iniziali della specificazione delle cellule beta (Arkhipova et al., 2012).

Studi genetici sui topi rivelano l'importanza del gene *HLXB9* nel consolidamento e nel mantenimento dell'identità dei motoneuroni tanto da esser considerato un marker del corretto sviluppo dei neuroni spinali. Per definire il ruolo di *HLXB9* nello sviluppo dei motoneuroni esso è stato comparato con altri tre markers tipici dei motoneuroni, *Lim3*, *Isl1* e *Isl2*. Durante la fase iniziale della formazione dei motoneuroni l'espressione di *HLXB9* coincide con quella di *Lim3* mentre non è espresso il gene *Isl1*. Negli stadi successivi di differenziamento invece a coincidere sono le espressioni dei geni *HLXB9* e *Isl1*, mentre si spegne il gene *Lim3*. Questo ha fatto ipotizzare che *HLXB9* possa avere un duplice ruolo: inizialmente, quando associato a *Lim3*, è coinvolto nella moltiplicazione delle cellule progenitrici dei motoneuroni; successivamente, nella fase coincidente con *Isl1*, avrebbe un ruolo nel differenziamento delle cellule progenitrici in motoneuroni. In accordo con quanto detto, i topi che mancano del gene *HLXB9* funzionante generano comunque un corretto numero di motoneuroni ma subiscono un drammatico cambiamento nel loro programma di differenziamento: anomalie nel pattern di migrazione, errori nella proiezione degli assoni motori e difetti nell'innervazione di alcuni muscoli target (Arber et al., 1999).

Infatti, la capacità dei neuroni di formare gli opportuni circuiti neuronali è una proprietà che viene sviluppata negli stadi precoci del loro differenziamento: i neuroni devono acquisire caratteristiche molecolari in grado di fornire il controllo delle proiezioni assonali e l'espressione di specifici trasmettitori chimici.

HLXB9: coinvolgimento nei tumori e nella sindrome di Currarino

I geni homeobox occupano un ruolo centrale nello sviluppo e nel differenziamento e proprio per questo una loro de-regolazione contribuisce all'instaurarsi di patologie, come quelle neoplastiche ma non solo.

Nell'uomo la diminuzione della funzionalità del gene *HLXB9* genera una patologia caratterizzata da agenesi sacrale e malformazioni rettali e uro-genitali nota come Sindrome di Currarino. Inoltre *HLXB9* e un altro membro della famiglia *EHG*, *GBX2*, sono stati associati alla comparsa della leucemia ma anche dei linfomi e dei tumori epatici.

Mentre l'espressione ectopica di *GBX2* è stata documentata nella leucemia aviaria quella di *HLXB9* è stata evidenziata in diversi casi di leucemia mieloide acuta infantile e nella linea cellulare leucemica GDM-1 (Nagel et al.,2005).

In uno studio del 2009 vengono analizzati dieci pazienti pediatrici affetti da leucemia mieloide acuta. Di questi, sette erano portatori di una traslocazione fra un cromosoma 7 e un cromosoma 12, mentre altri tre mancavano di anomalie per questi due cromosomi e furono usati perciò come controlli. La traslocazione t(7;12) è un riarrangiamento ricorrente nella leucemia mieloide acuta e coinvolge il gene *ETV6/TEL* al 12p13 e breakpoint eterogenei al 7q36 (Von Bergh AR, 2006).

Fu valutata l'espressione di alcuni trascritti, *ETV6*, *HLXB9*, *NOM1*, la fusione *HLXB9-ETV6* e la sua reciproca *ETV6-HLXB9* e infine la presenza del trascritto *NOM1-ETV6*. Il gene *HLXB9* fu trovato espresso in tutti i pazienti con t(7;12) e lo scopo dello studio fu quello di investigare come l'espressione ectopica di questo gene potesse essere legata ad una alterata localizzazione nucleare del frammento 7q36, che contiene il gene *HLXB9*, traslocato sul cromosoma 12 derivativo.

Un crescente numero di studi indicano infatti che l'architettura nucleare, nonché la compattazione di larghe regioni di DNA, il timing di replicazione e i relativi livelli di

espressione sono fattori emergenti nelle patologie umane, includendo il cancro. *HLXB9* si localizza nei nuclei di linfociti umani in periferia, cioè in un compartimento composto in larga parte da cromatina compatta e generalmente non espressa essendo un gene silenziato dopo lo sviluppo embrionale. Nelle cellule leucemiche con traslocazione 7;12 l'allele *HLXB9* traslocato mostra un cambiamento nella posizione radiale, dalla periferia nucleare ad una posizione più interna al nucleo mentre l'allele *HLXB9* wild-type mantiene la localizzazione periferica osservata nei controlli (Ballabio et al., 2009).

Il gene *HLXB9* è stato correlato anche ai carcinomi epatici e ai linfomi di Hodgkin.

La progressione dei carcinomi epatici è ancora poco chiara ma sembra essere collegata ad una dedifferenziazione delle cellule epatiche accompagnata dall'incremento dell'instabilità cromosomale (Wilkens et al., 2004). I carcinomi epatici molto differenziati sono rari, meno del 10% dei casi, mentre la dedifferenziazione è molto frequente ed è associata ad un decremento del tempo di sopravvivenza dei pazienti. Studiando un gruppo di linee cellulari epatiche poco differenziate mediante metodiche di analisi di espressione dell'mRNA è stato evidenziato il gene candidato per il dedifferenziamento che sembra essere proprio *HLXB9*. Questo gene infatti è risultato up-regolato sia nelle linee cellulari di epatocarcinoma (HLE, HLF, Huh7, HepG2 e Hep3b) che in quelle di colangiocarcinoma (EGI-1, MzCha1, TFK-1) comparate con linee cellulari epatiche non neoplastiche (Wilkens et al. 2011).

HLXB9 è stato inoltre studiato per il suo coinvolgimento nell'attivazione dell'interleuchina 6 (IL6) nei linfomi di Hodgkin. La secrezione di questa citochina riveste un ruolo patologico significativo in questo così come in altri tumori. Linee cellulari provenienti da pazienti con questa neoplasia ematica presentano una elevata espressione di *HLXB9* ma bassi livelli del prodotto proteico codificato: le cellule del linfoma di Hodgkin traslerrebbero quindi solo livelli moderati di *HLXB9*. I dati relativi a metodiche di FISH su cellule di linfoma di Hodgkin mostrano che non ci sono riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono il gene *HLXB9* e che possono in qualche modo giustificare una overespressione. Studi con oligonucleotidi antisenso diretti contro *HLXB9* per silenziarne l'espressione, con tecniche che permettono di indurre una overespressione e ancora con costrutti genici artificiali contenenti tutte le sequenze promotrici dell'IL6 hanno permesso

di mettere in evidenza il ruolo decisivo di *HLXB9* nell'attivazione dell'espressione dell'IL6 che viene valutata mediante RT-PCR (Nagel et al., 2005).

HLXB9 è stato già da diversi anni identificato come un locus implicato nella Sindrome di Currarino, patologia autosomica dominante conosciuta anche come *agenesi sacrale ereditaria* (HSA). Questa sindrome è caratterizzata dalla combinazione di una parziale assenza dell'osso sacro, da anomalie anorettali e da masse presacrali. Le malformazioni osservate nella sindrome di Currarino riflettono probabilmente disturbi della neurulazione secondaria, processo che si verifica nelle fasi precoci dello sviluppo (Hagan et al., 2000).

La manifestazione della sintomatologia è abbastanza variabile: il 39% dei pazienti presenta un fenotipo piuttosto grave, il 29% un fenotipo patologico apparente clinicamente, il 28% mostra cambiamenti solo ai raggi X mentre il 4% dei pazienti sono asintomatici. Le femmine sono più frequentemente affette da questa patologia presentando problemi associati al tratto urinario e ginecologico. Sono state identificate circa 35 mutazioni di *HLXB9* associati alla Sindrome di Currarino. Mutazioni non senso, delezioni o inserzioni che conducono ad errori di tipo frameshift, sono principalmente localizzate nella regione che precede l'homeodominio, mentre mutazioni missenso sono localizzate nella regione successiva. Queste mutazioni, sebbene colpiscano differenti regioni del gene, determinerebbero un'aploinsufficienza rispetto al livello totale di *HLXB9* che porta a circa metà della normale quantità di proteina prodotta da questo gene che determinerebbe il fenotipo patologico. Inoltre la presenza di vari gradi di severità della patologia dipenderebbero non solo da mutazioni di *MX1* ma anche, probabilmente, da geni sconosciuti che potrebbero agire come modificatori della penetranza delle mutazioni di *HLXB9* (Garcia-Barceló, 2009).

La proteina HB9: il prodotto proteico del gene HLXB9

In tutti i vertebrati la proteina HB9 mostra un pattern di espressione che è conservato nei motoneuroni, nell'endoderma pancreatico, nelle cellule beta-pancreatiche in differenziamento e nelle strutture mesodermali incluso la notocorda posteriore.

Accanto al suo ruolo nella differenziazione di tessuti che provengono dall'endoderma, dal mesoderma e dall'ectoderma, la funzione di HB9 in tessuti derivanti dal mesenchima, come le cellule ematopoietiche, è ancora sconosciuta.

Nelle cellule ematopoietiche mieloidi *HLXB9* è down-regolato dopo il differenziamento delle cellule progenitrici ematopoietiche. Uno studio evidenzia l'espressione elevata della proteina HB9 in cellule CD34+ del midollo osseo, mentre a seguito di differenziazione indotta con IL-3, il gene è down-regolato, con una bassa espressione proteica (Deguchi and Kehrl, 1991).

Come già menzionato, nei blasti provenienti da pazienti con traslocazione (7;12) e nella linea cellulare leucemica GDM-1 si ha una overespressione aberrante di *HLXB9*. Quale siano i target della proteina HB9 nelle cellule ematopoietiche non è ancora chiaro. Un recente studio, condotto da Wildenhain e suoi collaboratori nel 2012, ottenuto mediante analisi CHIP-on-chip rivela quattro target del fattore di trascrizione HB9, *ZYX* (*Zyxin*), *ETS1*, *IL8* e *PTGER2*, tutti coinvolti nel processo leucemico. Zyxin è una proteina LIM trovata principalmente sui siti di adesione cellulare, debolmente nelle proiezioni dei lamellipodi e in maniera transitoria nei nuclei cellulari. È presente in basse quantità e lega l' α -actina collaborando nell'assemblaggio dei filamenti di actina ma è capace anche di entrare nei nuclei cellulari e interagire con proteine coinvolte nel macchinario trascrizionale (Nix et al. 2001).

ETS1 appartiene alla famiglia EST di fattori di trascrizione caratterizzati da un dominio di legame al DNA di tipo elica giro elica denominato "dominio ETS", ed molto espresso durante lo sviluppo embrionale, in particolar modo durante la migrazione e il differenziamento delle cellule cardiache (Gao et al., 2010).

L'interleuchina-8 (IL8) appartiene alla famiglia delle chemochine CXC ed è associata alla promozione della degranulazione e della chemiotassi dei neutrofili. È stato dimostrato che l'interleuchina-8 è regolata da stimoli differenti come segnali di tipo infiammatorio, stress chimici e ambientali, ormoni steroidei ed inoltre sembra avere un ruolo nelle patologie tumorali aumentando la risposta angiogenetica, la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali (Waugh and Wilson, 2008).

PTGER2, risultato il più significativo fra i quattro target in studio, è un gene che codifica per un recettore della prostaglandina E2 (PGE2). Gli effetti della PGE2 sulle cellule ematopoietiche riguardano la modulazione dell'omeostasi del midollo osseo: la PGE2 infatti ha effetti antiproliferativi su varie cellule del sistema immunitario (Yagi et al., 2010). Inoltre è in studio come la down-regolazione del gene *PTGER2* provochi un meccanismo di perdita della prostaglandina E2 a livello del midollo osseo, derivato dagli effetti immunomodulatori, o moduli la differenziazione di cellule pre-leucemiche immature. È quindi stata suggerita una funzione tumore soppressiva di *PTGER2* nelle cellule ematopoietiche, osservata anche per il neuroblastoma dove un decremento nell'espressione del suddetto gene è collegato alla progressione delle cellule cancerose (Sugino et al., 2007).

Secondo lo studio condotto da Wildenhain sulle cellule mieloidi HL60, *HLXB9* agirebbe da repressore legandosi, mediante un dominio di legame contenuto nell'homeodominio, al promotore di *PTGER2* diminuendone così la sua espressione. Quando viene deleta la regione di legame di *HLXB9* al promotore di *PTGER2* quest'ultimo non è più down-regolato e viene espresso. Alterazioni dell'homeodominio di *HLXB9* impediscono il legame alla regione promotrice degli altri tre geni target, *IL8*, *ZYX* e *ETS1*, ma in questo caso questi geni, al contrario di *PTGER2*, mantengono le capacità regolative (Wildenhain et al., 2012).

Questo suggerirebbe l'esistenza di altri motivi di legame al DNA, non ancora identificati, lungo la lunghezza della proteina HB9 che sono critici per l'interazione dei geni target di questo fattore di trascrizione. Infatti, l'espressione genica è spesso controllata da cofattori reclutati nei complessi DNA-proteine così come nelle strutture secondarie o terziarie delle proteine. Inoltre l'espressione genica è spesso tessuto specifica, basata su un pathway di segnali e su cofattori correlati al tessuto stesso.

La proteina *PTGER2*

Il recettore per la prostaglandina E2 (PGE2) nel sottotipo EP2 (*PTGER2*), il cui gene è localizzato sul cromosoma 14 a livello della banda q22.1, è stato considerato negli ultimi anni un mediatore cruciale di molti eventi fisiologici e patologici. Nel cervello il recettore

EP2 influisce sulla neuroprotezione, sui fenomeni di eccito-tossicità, sulla neuroplasticità e l'apprendimento spaziale mediato dalla via cAMP-PKA. Quando viene attivato EP2 mediante la stimolazione della prostaglandina E2 i livelli citoplasmatici di cAMP aumentano scatenando l'azione del tipico effettore PKA. La PKA fosforila direttamente e attiva fattori di trascrizione noti come CREB (cAMP-responsive element binding protein), che mediano la plasticità neuronale, la formazione della memoria a lungo termine, la sopravvivenza neuronale e la neurogenesi nel cervello (Barco et al., 2006).

Precedentemente era stato identificato come effettore della cAMP la proteina Epac. In risposta al legame di cAMP Epac attiva Rap1/2 che media diversi processi biologici. Nel sistema nervoso centrale Epac può regolare l'apprendimento e la memoria, il differenziamento neuronale, l'eccitabilità neuronale, gli stress ossidativi, l'apoptosi neuronale e l'infiammazione. PKA ed Epac sono spesso coinvolti negli stessi processi biologici, in sinergia o con funzioni opposte. Per esempio, come la PKA anche Epac attiva direttamente CREB, mentre se la via che coinvolge la PKA è maggiormente collegata alla sopravvivenza neuronale, la via che coinvolge Epac può condurre a stress ossidativi e lesioni neuronali. La differente regolazione della PKA e di Epac attraverso il cAMP potrebbe dipendere dal gradiente citoplasmatico del cAMP poiché quest'ultimo ha una più bassa affinità per Epac rispetto alla PKA: all'inizio dell'attivazione del recettore EP2 cAMP stimola il pathway della pKA, mentre se l'attivazione di EP2 perdura e i livelli citoplasmatici del cAMP continuano a salire si attiva il pathway di Epac (Chun et al., 2009).

Il recettore PTGER2 è coinvolto anche nei processi infiammatori: le citochine infiammatorie infatti inducono l'espressione delle COX-2 che a loro volta attivano il secondo mediatore dell'infiammazione, la PGE2, che promuove la vasodilatazione locale e l'attivazione di neutrofili, macrofagi e mastociti. L'attivazione del recettore EP2, infatti, è accentuata nei fenomeni di infiammazione cronica, principalmente sempre attraverso il pathway cAMP-Epac.

I derivati prostanoidi hanno un possibile ruolo anche nella progressione dei tumori e nell'angiogenesi. In questo caso l'attivazione del recettore EP2 impegna la β -arrestina in un pathway indipendente dalla proteina G che promuoverebbe la crescita cellulare e la migrazione nei tumori (Jiang and Dingledine, 2013). Infatti delezioni a carico del recettore

EP2 per la prostaglandina sembrano ridurre la crescita e l'invasione di alcune tipologie di tumore, riducendo l'angiogenesi e promuovendo l'apoptosi. Il recettore EP2 regolerebbe lo sviluppo del tumore attraverso vari meccanismi che possono coinvolgere, ad esempio, ERK1/2, il pathway Ras/ERK o ancora i segnali mediati dalla via PI3K-Akt (Jiang and Dingledine 2013).

Uno studio del 2007 testa mediante RT-PCR l'espressione di *PTGER2* in 20 linee di neuroblastoma evidenziando che *PTGER2* è silenziato specialmente in quelle linee dove *MYCN* è amplificato, mediante meccanismi epigenetici che comprendono la metilazione del DNA e modificazioni degli istoni. La metilazione della regione promotrice di *PTGER2* è stata osservata più frequentemente negli stadi avanzati di neuroblastoma comparati con quelli allo stadio iniziale. Inoltre quando le cellule di neuroblastoma in cui il gene *PTGER2* endogeno è silenziato vengono transfettate con costrutti esprimenti il gene, le cellule diminuiscono la loro crescita e in parte vengono indotte in apoptosi (Sugino et al., 2007). Accanto a questi studi, però, ve ne sono altri che, al contrario, vedono la PGE2 implicata nella crescita tumorale, nella promozione dell'angiogenesi, nella stimolazione dell'invasione tumorale e nell'inibizione dell'apoptosi (Wang and DuBois, 2006).

È evidente perciò che il legame del recettore PTGER2 ai tumori è ancora in studio: i meccanismi epigenetici che silenziano geni oncosoppressori nel cancro, infatti, non sono completamente chiariti. È noto tuttavia, che i processi di metilazione inducono modificazioni a livello degli istoni, come per esempio le deacetilazioni, e questi processi conducono alla condensazione della cromatina che rende inaccessibili le sequenze di legame ai fattori di trascrizione, spegnendo il gene.

1.6 Il neuroblastoma

Origine dei neuroblasti e caratteristiche delle cellule nervose

I neuroni e le cellule gliali del sistema nervoso centrale derivano da una regione specializzata dell'ectoderma, la piastra neurale, che si trova lungo la linea mediana dorsale dell'embrione. Durante la neurulazione, la piastra neurale cambia gradualmente forma sollevandosi ai bordi. Tra i bordi, pliche neurali, si estende una depressione detta solco neurale e in seguito le pliche si fondono lungo la linea mediana dorsale dell'embrione formando così il tubo neurale.

Dai margini laterali delle pliche neurali prolifera verso il mesoderma un importante gruppo di cellule dette cellule della cresta neurale, che dà origine al sistema nervoso periferico, alle cellule adrenergiche cromaffini, ai melanociti e alla scatola cranica, naso, mascelle e ossa del collo, nonché a parte delle meningi. Le cellule epiteliali delimitanti le pareti del tubo neurale proliferano, generando i precursori delle cellule gliali (glioblasti) e dei neuroni (neuroblasti) del SNC e infine migrano per raggiungere la loro localizzazione anatomica. I neuroblasti sono all'inizio cellule voluminose e ovali; in seguito emettono due espansioni ai poli opposti, diventando neuroblasti bipolari, e infine, dopo la retrazione di una delle espansioni, diventano unipolari. Il differenziamento istologico che trasforma una cellula dello strato germinale in neuroblasto si verifica tra la terza e la quarta settimana di sviluppo, alla fine della quale sono già identificabili le radici anteriori dei nervi spinali, costituite dall'unione delle espansioni assoniche dei neuroblasti unipolari presenti nella parte ventrale del tubo nervoso.

Più complessa è l'origine delle radici posteriori. Al momento della formazione del tubo neurale le creste neurali si fondono in un'unica massa, a forma di cuneo, lungo la linea mediana, formando la cresta gangliare. Le cellule della cresta proliferano dando poi luogo ai gangli spinali primitivi che migrano in direzione latero-ventrale. Dai gangli primitivi si separano, ventralmente, le cellule simpato-cromaffini, che danno luogo ai gangli simpatici, nonché le cellule cromaffini. Le cellule della cresta neurale sono dotate di grande plasticità, potendo differenziarsi in un gran numero di cellule diverse, a seconda della sede in cui vengono a trovarsi durante la loro migrazione (Rosati, 2000).

I neuroni rappresentano una componente del parenchima cerebrale in grado di generare un potenziale d'azione in seguito ad eccitazione elettrica e di propagarlo lungo i loro prolungamenti senza decremento. Questa capacità è resa possibile dalla presenza sulla membrana cellulare di un'alta concentrazione di specifiche proteine, i canali voltaggio-dipendenti, e sulla membrana assonale di un isolante, la mielina.

Sebbene i neuroni posseggano una certa plasticità di forme e vadano incontro ad un costante rimodellamento delle connessioni sinaptiche, essi condividono una simile struttura. Ogni neurone invia informazioni ad altri neuroni o a cellule efferenti mediante un prolungamento del proprio corpo cellulare (definito anche soma o pirenoforo) di vario diametro e lunghezza, più o meno arborizzato, chiamato assone, e riceve informazioni da altri neuroni o cellule degli organi di senso mediante un diverso gruppo di prolungamenti citoplasmatici, maggiormente arborizzati, più corti e sottili dell'assone, detti dendriti.

Morfologicamente i neuroni possono essere multipolari (neuroni stellati, cellule piramidali, cellule del Purkinje), unipolari o pseudounipolari (coni e bastoncelli della retina, gangli spinali ed encefalici) e bipolari (negli strati intermedi della retina e nei gangli vestibolari e cocleare). L'interazione tra neuroni o tra neuroni e altre cellule è alla base dell'attività funzionale di ogni cellula nervosa del SNC. Tale interazione è definita sinapsi e può essere chimica, mediata da neurotrasmettitori, o elettrica (D'Amato et al., 2011).

I neuroni, però, non sono gli unici componenti del tessuto nervoso che comprende anche le cellule gliali o nevroglia. Le cellule nervose propriamente dette, cioè i neuroni, dipendono infatti per il loro trofismo, per la loro maturazione e per il corretto instaurarsi di rapporti reciproci, dall'attività strutturale e funzionale delle cellule gliali (astrociti, oligodendrociti, cellule ependimali). Le principali funzioni delle cellule gliali sono il sostegno meccanico, il sostegno trofico, la capacità di modulare le attività delle cellule nervose, la regolazione della concentrazione degli ioni e lo smaltimento dei mediatori chimici.

Classificazione e genetica del neuroblastoma

Il neuroblastoma è un tumore maligno del sistema nervoso simpatico che colpisce prevalentemente i bambini al di sotto dei 5 anni. Rappresenta il 7-8% dei tumori

pediatrici. È un tumore extra-craniale e si instaura quando i neuroblasti diventano anormali iniziando una moltiplicazione incontrollata che porta alla formazione del tumore. Pur originando dai progenitori del sistema nervoso simpatico può diffondersi in altre parti del corpo, includendo le ossa, l'addome, il torace, la pelle e il fegato. I pazienti con neuroblastoma mostrano dei sintomi iniziali quali affaticamento, pallore, perdita di peso e di appetito, diarrea, irritabilità e perdita di memoria. Sintomi più specifici dipendono poi dalla localizzazione del tumore e dai siti delle eventuali metastasi (Hayat, 2012). Il decorso della malattia è influenzato sia dell'età del paziente che dalle anomalie genetiche che caratterizzano il tumore.

Mutazioni somatiche in almeno due geni sono causa di quello che viene definito neuroblastoma sporadico. Quando le mutazioni sono ereditate, la condizione è chiamata, invece, neuroblastoma familiare, il quale è meno comune. Mutazioni a carico del gene *ALK* (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase), localizzato sul cromosoma 2 a livello della banda p23, e *PHOX2B* (paired-like homeobox 2b), localizzato sul cromosoma 4p12, incrementano il rischio di sviluppo di neuroblastoma. L'attività chinasi aberrante di *ALK* può essere attribuita all'amplificazione o attivazione di mutazioni principalmente all'interno del dominio tirosin chinasi della proteina. Queste mutazioni, che possono condurre al neuroblastoma, sono state dimostrate nella linea germinale di alte percentuali di casi di neuroblastoma familiare e nel 6-12% dei casi sporadici.

PHOX2B, è stato il primo gene determinato nei casi di neuroblastoma familiare. Gli individui affetti da questa tipologia di neuroblastoma hanno caratteristiche fenotipiche di altri disordini derivanti dalle creste neurali, principalmente la sindrome di ipoventilazione centrale congenita (CCHS). Mutazioni a carico di questo gene ricorrono nel 6,4% dei casi di neuroblastoma familiare mentre sono rari nei casi sporadici della malattia. *PHOX2B* è un fattore di trascrizione e gioca un ruolo critico nel normale sviluppo delle strutture derivate dalle creste neurali (Sridhar et al., 2013). Infatti le mutazioni che colpiscono il gene *PHOX2B* interferiscono sulla funzionalità del prodotto proteico di tale gene. Inoltre il gene *FAK* (Focal adhesion kinase), che codifica per una chinasi intracellulare che regola sia l'adesione che la morte cellulare, è overespresso nel neuroblastoma (Hayat, 2012).

Anche il gene *MYCN* è un fattore prognostico della malattia. *MYCN* appartiene alla famiglia *MYC* di fattori di trascrizione, insieme a *C-MYC* e *L-MYC*. *MYCN* è prevalentemente espresso nel sistema nervoso centrale e periferico, nel polmone, nella pelle e nella milza durante lo sviluppo embrionale ed è soggetto a variazioni di espressione molto precise fra la vita fetale e quella adulta. È definito, inoltre, come un oncogene che agisce da regolatore trascrizionale positivo. Ad esempio stimola il rientro nel ciclo cellulare delle cellule in quiescenza, mentre la sua riduzione promuove l'arresto del ciclo cellulare, la differenziazione e l'apoptosi. Nel neuroblastoma *MYCN* gioca un ruolo centrale nell'invasività e quindi nella formazione delle metastasi, attraverso diretta o indiretta repressione di specifici geni target (Gherardi et al., 2013). Anche l'angiogenesi, che è un marker patologico importante nel neuroblastoma, è influenzata da questo oncogene: *MYCN* ha infatti sia la capacità di attivare la trascrizione di fattori angiogenetici sia la capacità di reprimere la trascrizione degli inibitori angiogenetici, come Activin A o IL-6 (Hatzi et al., 2002; Breit et al., 2000). Inoltre contribuisce allo sviluppo del neuroblastoma attraverso la repressione del gene *NGFR* (nerve growth factor receptor), che codifica per un recettore di membrana che lega le neurotrofine. Il ruolo di questo gene nel neuroblastoma non è ancora chiarito ma recentemente è stato dimostrato che *MYCN* potrebbe legarsi al promotore di *NGFR* reprimendone la sua espressione (Iraci et al., 2011). Infine *MYCN* reprime geni con caratteristiche anti-apoptotiche come la Galectin-3 suggerendo uno sbilanciamento della regolazione dell'apoptosi (Veschi et al., 2012). Per tutte le caratteristiche enunciate, l'oncogene *MYCN* è un indicatore negativo che influenza proliferazione e avanzamento della patologia, sopravvivenza del paziente e resistenza alle terapie farmacologiche.

Sono state riscontrate nelle cellule somatiche di pazienti affetti da neuroblastoma diverse mutazioni cromosomiche. Un'alterazione genetica fra le più ricorrenti è una delezione sul braccio corto del cromosoma 1 trovata nel 35% dei neuroblastomi: la banda 1p36 è la più colpita dalla delezione e proprio in questa regione si trova il gene oncosoppressore p73. Frequenti riarrangiamenti coinvolgono inoltre il cromosoma 11, in particolare la perdita in eterozigosi della regione 11q, la regione 3p e 17q e tali anomalie sono associate ad una prognosi severa della malattia (Schleiermacher et al., 2010).

Le alterazioni osservate nel neuroblastoma non sono distribuite casualmente ma in specifiche regioni cromosomiche. Ciò probabilmente ha un ruolo nell'oncogenesi e nello sviluppo del tumore potendo influire sulla diminuzione di geni oncosoppressori localizzati all'interno delle regioni delete o sull'aumento di oncogeni all'interno delle regioni duplicate, conferendo così un vantaggio selettivo alle cellule.

Cellule SK-N-BE

Le cellule SK-N-BE sono state immortalizzate nel Giugno del 1972 da una biopsia di midollo osseo di un bambino di soli due anni con un neuroblastoma disseminato. Una successiva biopsia nel Novembre del 1972 dallo stesso paziente diede una seconda linea cellulare denominata SK-N-BE(2). Le linee cellulari sono simili nella morfologia e consistono di piccole cellule con corti processi cellulari simili a neuriti. Queste cellule crescono in monostrato alla temperatura di 37° C con il 5% di CO₂ in terreno RPMI 1640 addizionato con il 10% di FBS (fetal bovin serum), l'1% di P/S (Penicillin/streptomycin) e 1% di L-glutamina.

Il cariotipo delle SK-N-BE(1) è costituito da 46 cromosomi mentre quello delle SK-N-BE(2) da 44 (Biedler et al., 1978).

Il cariotipo delle SK-N-BE(1) è 46XY, del(1)(p32), der(3)t(3;17)(p21;q21), der(4)t(1;4)(q21;35), dmin. È stato dimostrato che i double minutes, piccoli frammenti di DNA extracromosomale, rappresentano in questo caso siti di amplificazione dell'oncogene *MYCN*. Il painting cromosomico sulle metafasi conferma la presenza di due cromosomi 17 normali con l'aggiunta di un frammento piuttosto consistente del 17 che trasloca sul cromosoma 3. Il cariotipo delle SK-N-BE(2) è più complesso e include ulteriori riarrangiamenti sui cromosomi 2, 9, 11, 13, 15, 16 e 19. Inoltre è presente in questa linea un solo cromosoma 17 normale e un frammento che trasloca, come detto sopra, sul cromosoma 3. La delezione 1p e la duplicazione del frammento 17q sono le anomalie più frequentemente osservate nei casi aggressivi di neuroblastoma. La perdita di una copia del cromosoma 17 implica che la linea SK-N-BE(2) è monoallelica per il gene oncosoppressore p73 esprimendo quindi livelli molto bassi della corrispondente proteina. Poiché le SK-N-BE(2) sono state isolate dal paziente a seguito di trattamento citotossico

con chemioterapici e dopo radioterapia esse sono più resistenti a questi agenti rispetto alle SK-N-BE(1). La concentrazione di sostanze chemioterapiche richieste per uccidere il 90% delle SK-N-BE(2) è 9230 volte superiore di quella richiesta per le SK-N-BE(1) (Twedde et al., 2001).

Sia la SK-N-BE(1) che la SK-N-BE(2) hanno proprietà simili a quelle dei neuroni compresa la capacità di sintetizzare e immagazzinare neurotrasmettitori. Inoltre possiedono un livello piuttosto alto di attività dopamina- β -idrossilasi e convertono il glutammato in GABA. È chiaro che i livelli di GABA delle cellule delle linee SK-N-BE non sono paragonabili a quelli, molto più alti, presenti nel tessuto cerebrale (Biedler et al., 1978).

La capacità di molte linee cellulari di neuroblastoma di differenziarsi in risposta a vari agenti biologici ha portato all'utilizzo delle suddette linee cellulari come sistemi modello per studi sullo sviluppo delle cellule neuronali e neuroendocrine. Sono stati individuati già da tempo degli agenti in grado di indurre un differenziamento terminale e che al contempo non siano citossici: i retinoidi, per esempio, inducono una marcata differenziazione e arrestano il ciclo cellulare. Le cellule di neuroblastoma esprimono costitutivamente i recettori per i retinoidi RAR α , RAR β , RAR γ e RXRs e concentrazioni nanomolari di retinoidi sono sufficienti per incrementare l'espressione di RAR β che induce l'estensione del neurite; tuttavia sono necessarie concentrazioni micromolari per inibire significativamente la crescita cellulare sotto condizioni standard (Matsumoto et al., 1995). La differenziazione comporta la formazione di estesi processi neuritici che sono strutturalmente e elettrofisiologicamente simili ai neuroni normali, il decremento nel numero di proto-oncogene *N-MYC*, *C-MYC*, *B-MYC* e l'incremento del recettore TrkB (TrkB tyrosine kinase o neurotrophic tyrosine kinase) e del recettore RET, nonché delle loro attività chinasiche (D'Alessio et al., 1995).

I retinoidi e l'acido retinoico

L'acido retinoico (RA) è un derivato della vitamina A, da molto tempo conosciuta perché indispensabile per la vista. Ad esempio il derivato aldeidico della vitamina A, la retinaldeide, agisce come molecola sensibile alla luce e la sua isomerizzazione innesca il

processo di fototrasduzione delle cellule fotorecetttrici della retina. Molte altre funzioni sono state attribuite a questa vitamina, e diversi studi che utilizzano come modelli gli uccelli e i roditori hanno stabilito che una deficienza materna di vitamina A conduce a diverse anomalie negli embrioni e nel feto (White et al., 2000).

L'acido retinoico è una piccola molecola lipofila che agisce come ligando per i recettori dell'RA, i RARs, convertendoli da repressori trascrizionali ad attivatori. La distribuzione e i livelli di acido retinoico nei tessuti embrionali sono strettamente controllati da enzimi di sintesi e del metabolismo. Durante lo sviluppo embrionale sembra infatti che l'acido retinoico abbia un ruolo fondamentale, agendo sui progenitori del proencefalo embrionale, della piastra neurale e del mesoderma posteriore durante l'allungamento assiale dell'embrione (Tang et al., 2011).

I retinoidi, proprio per queste loro capacità, sono ampiamente usati in terapia e in molti protocolli per differenziare colture primarie o linee cellulari. Inoltre vengono studiati per un utilizzo futuro nelle terapie basate sulle cellule staminali e nella medicina rigenerativa. Per esempio, è stato scoperto che l'aggiunta di acido retinoico alle cellule staminali embrionali di topo, conduce alla generazione di progenitori neurali con caratteristiche di cellule gliali tipiche dello sviluppo del sistema nervoso centrale. Quando queste cellule vengono coltivate in vitro, possono differenziarsi in neuroni che stabiliscono contatti sinaptici e esibiscono proprietà elettrofisiologiche simili a quelle neuronali piramidali del proencefalo (Bibel et al., 2004).

L'unica fonte di retinoidi nella maggior parte degli animali è la dieta, poiché i suoi componenti non possono essere sintetizzati de novo. L'omeostasi del retinolo coinvolge diverse proteine ed enzimi che regolano il suo uptake nelle cellule intestinali a seguito di ingestione con la dieta e il suo immagazzinamento negli epatociti e nelle cellule stellate del fegato (D'Ambrosio et al., 2011). La fonte principale di acido retinoico negli embrioni deriva da quello trasferito attraverso la placenta dalla madre.

Nei mammiferi la principale forma circolante di retinoidi è il retinolo legato alla proteina carrier RBP4. Tipicamente, il retinolo legato alla proteina RBP4 è prelevato dai tessuti target e l'ingresso è facilitato in alcuni tessuti da proteine trans-membrana che sono prodotti del gene *STRA6*, inducibile dall'acido retinoico.

L'acido retinoico viene prodotto mediante una prima ossidazione del retinolo a retinaldeide e una successiva che porta dalla molecola di retinaldeide all'acido retinoico. La prima ossidazione è effettuata da due classi enzimatiche, le alcol deidrogenasi citosoliche e le retinolo deidrogenasi. La seconda ossidazione è invece effettuata da tre retinaldeide-deidrogenasi.

La distribuzione e i livelli di acido retinoico sono finemente regolati durante l'embriogenesi e inoltre un importante livello di controllo è ottenuto attraverso il metabolismo ossidativo tessuto specifico. Enzimi del citocromo P450 della sottofamiglia 26, come CYP26A1, CYP26B1 e CYP26C1, catalizzano reazioni che convertono l'acido retinoico in più metaboliti polari, principalmente il 4-idrossi-RA, che può essere successivamente ossidato a 4-oxo-RA. È stato osservato come gli enzimi del CYP26 svolgono maggiori funzioni durante lo sviluppo per prevenire effetti dannosi e teratogeni dell'acido retinoico endogeno (Rhinn et al., 2012).



Fig. 9: Reazioni implicate nella produzione dell'acido retinoico.

1.7 Marcatori neuronali

La proteina GAP-43 (Growth associated protein 43)

GAP-43, conosciuta anche come neuromodulina e B-50, è una proteina che gioca un ruolo fondamentale nella morfologia neuronale, sia in condizioni normali che in condizioni traumatiche. È una proteina molto studiata perché coinvolta nella crescita del cono assonale e viene considerata un marker dello sviluppo e della differenziazione neuronale, della diramazione e del percorso assonale durante lo sviluppo.

GAP-43 è uno dei maggiori substrati per la proteina chinasi C (PKC) nei terminali presinaptici. Essa è fosforilata dalla PKC alla serina 41 e la sua fosforilazione è stata correlata all'aumento del rilascio di trasmettitori nei sinaptosomi. Inoltre GAP-43 lega la calmodulina suggerendo che essa potrebbe essere un suo carrier (Casolia et al., 2003). Recenti studi hanno dimostrato che la proteina GAP-43 è correlata alle divisioni asimmetriche durante la neurogenesi e che colocalizza con i centrosomi. La sua assenza infatti, conduce ad un posizionamento anormale del fuso mitotico con conseguente divisione asimmetrica durante la neurogenesi (Mishra et al. 2008).

Il gene della GAP-43 è localizzato sul cromosoma 3 umano a livello della banda 3q13.1-q13.2 e si estende per circa 50 Kb. Contiene tre esoni: il primo include la regione 5'UTR di lunghezza variabile e i primi dieci codoni; il secondo esone contiene la maggior parte della regione codificante mentre il terzo esone include gli ultimi codoni e una lunga regione 3'UTR. Le due isoforme della proteina prodotta da questo gene sono di 274 e di 238 aminoacidi. La regione N-terminale di GAP-43, formata da 57 aminoacidi, è altamente conservata fra i vertebrati, mentre la regione C-terminale dei pesci, del pollo e della rana mostra un grado variabile di divergenza dalle sequenze dei mammiferi. Il decimo aminoacido codificato dall'esone 1 è cruciale per il legame della proteina alle membrane delle terminazioni nervose, mentre la calmodulina lega una regione specifica, chiamata dominio IQ, che si estende dal dodicesimo al quindicesimo aminoacido (Kosik et al., 1988).

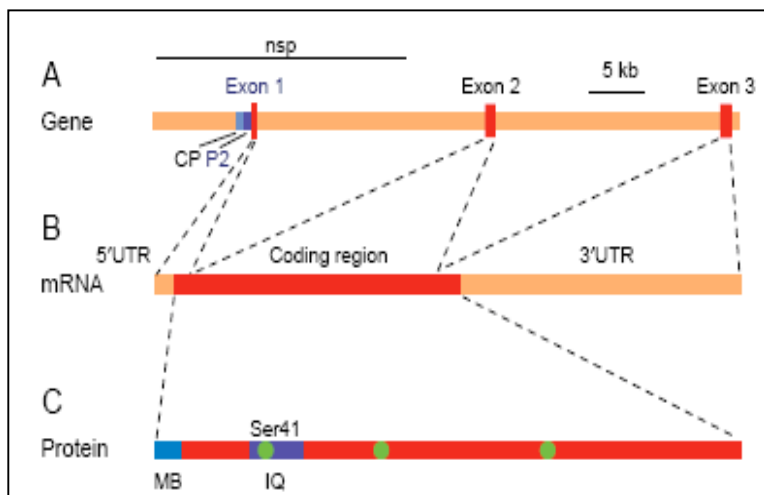


Fig. 10: A) Il gene *GAP-43* con i tre esoni mostrati in rosso; B) mRNA del gene *GAP-43*, contenente una regione 5'UTR di 50-55 nucleotidi, una regione codificante di 681 basi (in rosso) e la regione 3'UTR di 600-700 nucleotidi; C) proteina codificata dal gene *GAP-43* in cui sono mostrati la regione N-terminale (MB) e il sito di legame per la Calmodulina (regione IQ) (da Benowitz and Routtenberg, 1997).

L'attività della proteina GAP-43 sembrerebbe regolata dall'azione opposta della calmodulina e della proteina-chinasi C (PKC). GAP-43 ha maggiore affinità per la calmodulina in assenza di ioni Calcio e quando la calmodulina è legata al suo dominio sulla GAP-43 la proteina-chinasi C risulta inibita e non può fosforilare la Ser 41. Quando però i livelli di Calcio intracellulare aumentano, come accade durante la trasmissione dell'impulso nervoso, la calmodulina non riesce a legarsi al suo dominio specifico e viene resa possibile la fosforilazione da parte della PKC. Quando GAP-43 si trova fosforilata riesce ad interagire con gli elementi del citoscheletro rendendo così possibili rimodellamenti sinaptici e dell'assone (Benowitz and Routtenberg, 1997).

Proprio per il ruolo che la GAP-43 gioca nella crescita dell'assone e nella modulazione della formazione di nuove connessioni, sono stati studiati gli effetti della over-espressione di questo gene in topi transgenici che hanno mostrato, come conseguenza, formazioni spontanee di connessioni aberranti (Aigner et al., 1995).

È stato visto inoltre che i topi che mancano della proteina codificata da questo gene hanno una bassa sopravvivenza nel primo periodo post natale, mentre negli umani una delezione in eterozigosi nel locus del gene *GAP-43* (3q13.10 - 3q13.21) è collegata alla agenesi del corpo calloso e a diversi ritardi mentali (Grasselli et al., 2013).

L'espressione del gene *GAP-43* è concentrata primariamente durante lo sviluppo del cervello mentre declina in più regioni cerebrali quando la sinaptogenesi è completa. Tuttavia la proteina GAP-43 gioca un ruolo fondamentale non solo durante lo sviluppo ma

anche nel rimodellamento assonale del cervello adulto. I livelli di espressione del rispettivo gene aumentano in diverse condizioni che inducono la rigenerazione dei neuroni, come la distruzione del networks neuronale a causa di una lesione traumatica o patologica. *GAP-43* è sovra-espresso nei motoneuroni di topi transgenici distrofina deficienti, in cui eventi di degenerazione-rigenerazione nelle fibre muscolari sono accompagnati da rimodellamento delle fibre nervose terminali intramuscolari, e dopo l'induzione di forte attività neuronale per esempio attraverso stimolazione elettrica. L'espressione di *GAP-43* declina nella corteccia frontale e in certe aree dell'ippocampo nei pazienti con Alzheimer mentre è in forte associazione con le placche senili. Inoltre i livelli di *GAP-43* subiscono un decremento in molte lesioni della materia bianca di pazienti con sclerosi multipla (Teunissen et al., 2006).

GAP-43 è una proteina necessaria per l'interazione ottimale dell'assone con il suo target neuronale e l'organizzazione del macchinario molecolare che supporta la struttura assonale durante la crescita assonale. Inoltre molti studi hanno stabilito il suo coinvolgimento nel rilascio dei neurotrasmettitori e nella plasticità sinaptica (Holahan et al., 2010), interagendo direttamente con i componenti del macchinario sinaptico come SNAp-25, la syntaxina e VAMP.

È possibile affermare quindi che *GAP-43* ha un duplice ruolo sia nel mantenimento delle strutture nervose e nella diramazione delle fibre nervose sia in condizioni normali che nella rigenerazione delle terminazioni assonali a seguito di stress o lesioni. In aggiunta sembra regolare l'organizzazione della diramazione dei terminali pre-sinaptici e il rilascio di neurotrasmettitori.

La proteina Tau

Strutture citoscheletriche importantissime coinvolte nel mantenimento della morfologia neuronale e nella formazione dei processi assonali e dendritici sono i microtubuli. La polimerizzazione, la stabilità e l'organizzazione dei microtubuli sono regolate da proteine associate ad essi come le MAP1, le MAP2 e Tau.

La proteina Tau è uno dei principali costituenti della componente neuro fibrillare; è stata isolata per la prima volta nel 1975 come proteina purificata insieme alla tubulina ed ha la capacità di favorire l'assemblaggio dei microtubuli in vitro (Cleveland et al., 1977).

Tau è localizzata prevalentemente nell'assone dove genera uno stato parzialmente stabile ma anche dinamico dei microtubuli importante per la crescita e il trasporto assonale. Inoltre, in una forma fosforilata, è presente nel compartimento somato-dendritico del neurone, negli astrociti e nelle cellule gliali perineuronali e alcuni studi evidenziano una possibile interazione di Tau con l'actina, con la membrana plasmatica e con molte proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (Arrasate et al., 2000).

La proteina Tau è codificata dal gene MAPT, localizzato sul cromosoma 17 a livello della banda q21 e contenente 16 esoni. Nel cervello adulto umano lo splicing alternativo che coinvolge gli esoni 2, 3 e 10 porta alla formazione di 12 trascritti di mRNA e di 7 isoforme di Tau (Trabzuni et al., 2012). Le isoforme differiscono per la presenza o l'assenza di uno o due inserti acidi alla coda N- terminale e inoltre contengono tre o quattro ripetizioni di un motivo conservato alla coda C-terminale. Queste regioni ripetute legano i microtubuli e promuovono il loro assemblaggio. Le isoforme di Tau con 4 ripetizioni (4R-Tau) legano i microtubuli con una maggiore affinità delle isoforme con tre ripetizioni (3R-Tau). La fosforilazione di alcuni residui all'interno delle regioni ripetute diminuiscono l'interazione fra Tau e i microtubuli, provocando il distacco di Tau. La metà N-terminale di tau, conosciuta come "dominio di proiezione" poiché protude dalla superficie dei microtubuli, include regioni acide e regioni ricche in prolina. Questo dominio di proiezione determinerebbe una spaziatura fra i microtubuli e probabilmente una interazione fra Tau e altre proteine citoscheletriche (Hirokawa et al., 1988).

È stato osservato che un rapporto anormale e alto di Tau in 3R o 4R porta a morte cellulare neuronale mediante alterazione delle normali funzioni di Tau nel neurone adulto. Questo avverrebbe probabilmente per un "effetto di dosaggio" o un modello di aplo-insufficienza in cui entrambi gli alleli di Tau devono essere attivi e regolati positivamente per produrre appropriate quantità di ciascuna isoforma di Tau al fine di mantenere il dinamismo dei microtubuli dentro una range di tollerabilità (Panda et al., 2003). Infatti, mutazioni di Tau collegate all'alterazione delle proporzioni delle varie

isoforme della proteina, determinano una diminuzione dell'abilità di questa di legare e promuovere l'assemblaggio dei microtubuli e un aumento degli aggregati di Tau dentro i filamenti.

La proteina Tau è coinvolta nel morbo di Alzheimer e nelle taupatie; l'accumulo degli aggregati proteici è una caratteristica patologica di molti disordini neurologici che possono portare a morte cellulare. Nelle taupatie questi aggregati sono formati da grovigli neuro-fibrillari composti proprio dalla proteina Tau. Questo gruppo di malattie include l'Alzheimer, la demenza frontale temporale con Parkinsonismo legato al cromosoma 17, la paralisi sopranucleare progressiva, la malattia di Pick e le degenerazioni cortico basali.

Le funzioni di Tau sono regolate da modificazioni post-traslazionali, quale per esempio la fosforilazione e proprio le varianti iperfosforilate di tau sono ben studiate perché coinvolte nella malattia di Alzheimer.

Sono stati descritti polimorfismi del gene MAPT e identificati due differenti aplotipi: H1 e H2. L'aplotipo H1 è un fattore di rischio per la paralisi sopranucleare progressiva, probabilmente incrementando i livelli di espressione di Tau o sbilanciando l'espressione dei trascritti alternativi. L'aplotipo H1 è il più comune negli umani, mentre l'aplotipo H2 è molto comune nei primati non umani. Inoltre è stato notato che il cervello degli scimpanzé mostra resistenza allo sviluppo delle taupatie e potrebbero essere responsabili di ciò differenze nelle sequenze introniche del gene MAPT (Holzer et al.,2004).

Sebbene Tau sia stata descritta inizialmente come proteina citosolica, essa ha anche una localizzazione nucleare sia in cellule nervose che in altre tipologie cellulari come cellule HeLa (carcinoma ovarico), cellule di epatoma Huh-7 e linfociti. Nelle cellule mitotiche la Tau nucleare è associata con le regioni di organizzazione nucleolare (NORs), parzialmente colocalizzata con la proteina nucleolina e le sequenze alfa satellite ricche in AT organizzate come eterocromatina costitutiva, suggerendo che possa avere un ruolo nell'organizzazione del nucleolo.

In tutte le cellule non neuronali studiate le isoforme di Tau riscontrate mediante l'utilizzo di anticorpi specifici sono state la Tau-1 e la Tau-5. In particolare nei linfociti stimolati dalla PHA (fitoemoagglutinina) è stata riscontrata una up-regolazione di Tau

nucleolare ed è quindi stato ipotizzato che questa proteina possa essere coinvolta, durante la divisione cellulare indotta dalla PHA, in alcuni aspetti della sintesi, del processamento e del trasporto dell'rRNA (Thurston et al., 1995).

Infine la proteina Tau e i livelli di espressione dell'mRNA vengono utilizzati come marcatori delle cellule nervose mature che hanno subito un processo di differenziamento in vitro, così come GAP-43, MAP2, β -tubulina, Neu-N e la sinaptosina (Xie et al., 2010).

1.8 Apoptosi

La morte cellulare nel sistema nervoso è un carattere tipico dello sviluppo precoce. Accade durante la neurogenesi, nei neuroni post-mitotici, è usato come controllo della quantità di glia così come degli oligodendrociti e dei nervi ottici. Tuttavia questa morte cellulare, attraverso diversi studi, è stato visto essere non puramente apoptotica né necrotica ma un insieme di queste.

Le cellule apoptotiche possono essere riconosciute da tipici cambiamenti morfologici: il restringimento dell'intera cellula che porta ad una deformazione e alla perdita dei contatti con le cellule vicine, la condensazione della cromatina spinta ai margini della membrana nucleare, la vescicolazione della membrana plasmatica ed infine la frammentazione della cellula in strutture chiuse da membrana chiamate corpi apoptotici che contengono citosol, cromatina condensata e organelli. I corpi apoptotici sono fagocitati dai macrofagi e rimossi dai tessuti per evitare l'istaurarsi di un processo infiammatorio. È stato dimostrato che il decremento del volume apoptotico è un cambiamento precoce della morte cellulare per apoptosi e rappresenta una chiave per discriminare l'apoptosi dalla necrosi in cui si ha, al posto di restringimento, un rigonfiamento cellulare. Nella necrosi le cellule subiscono un danno importante, con conseguente perdita di integrità della membrana, gonfiore e distruzione. I contenuti cellulari vengono rilasciati nell'ambiente circostante provocando danni alle cellule vicine e una forte risposta infiammatoria (Leist et al., 2001).

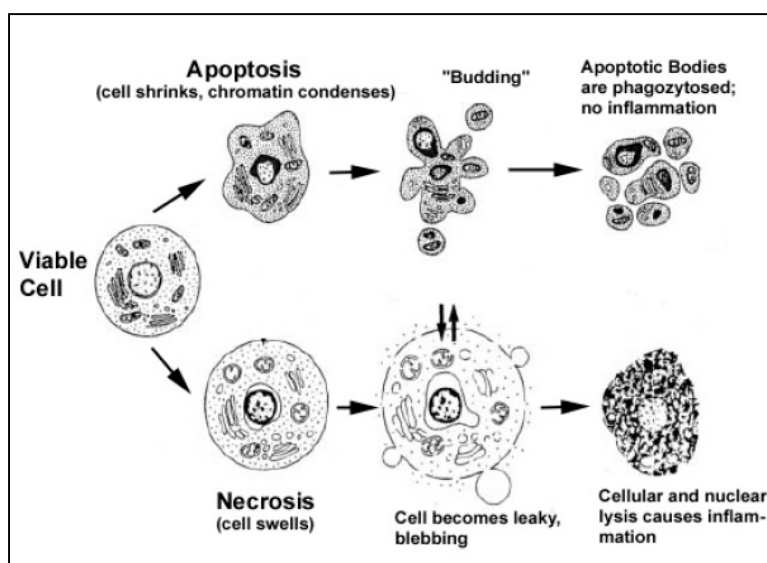


Fig. 11: Caratteristiche del processo apoptotico e necrotico. L'apoptosi è caratterizzata da restringimento cellulare, condensazione della cromatina e formazione di corpi apoptotici. Le cellule necrotiche invece rigonfiano e successivamente perdono l'integrità rilasciando i contenuti cellulari nell'ambiente circostante (modificato da Van Cruchten et al., 2002).

L'apoptosi può essere innescata da stimoli interni o esterni alla cellula come danni al DNA causati da difetti del meccanismo di riparazione del DNA, trattamento con sostanze citotossiche o irradiazione, dalla mancanza di segnali di sopravvivenza o da segnali contraddittori a quelli del ciclo cellulare o ancora da segnali di "morte".

Le caspasi (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) rivestono un ruolo importante nei segnali che conducono le cellule alla morte per apoptosi; hanno inoltre un'attività catalitica dipendente dai residui di cisteina all'interno di un pentapeptide altamente conservato. Nelle cellule le caspasi sono sintetizzate come zimogeni inattivi, chiamati procaspasi, che portano nella porzione N-terminale un pro-dominio seguito da grandi e piccole subunità talvolta separate da peptidi di collegamento. Dopo la maturazione le caspasi attive sono costituite da un tetramero formato da due subunità piccole e due subunità grandi. Le caspasi coinvolte nel processo pro-apoptotico possono essere divise in due gruppi: le caspasi iniziatrici, la procaspasi 2, 8, 9 e 10, e le caspasi esecutrici come la procaspasi 3, 6 e 7. Mentre le caspasi esecutrici possiedono un corto prodominio, le caspasi iniziatrici possiedono lunghi pro-domini contenenti domini "effettori di morte" (DED) come nelle procaspasi 8 e 9, o domini di reclutamento per le caspasi (CARD) come nei casi delle procaspasi 9 e 2 (Rastagi et al., 2009).

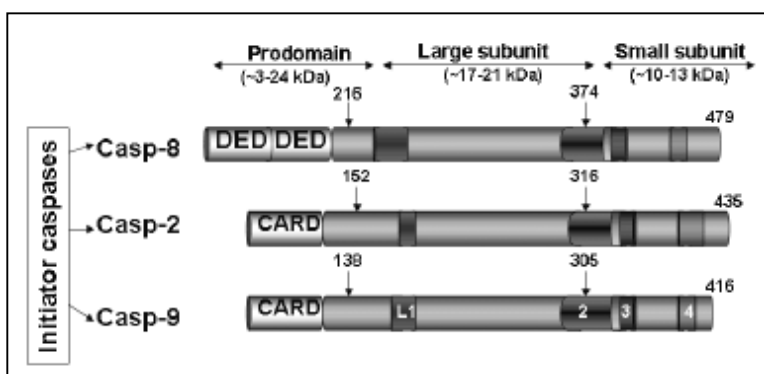


Fig. 12: Organizzazione delle procaspasi nei mammiferi aventi sia domini CARD che DED associati con lunghi prodomini. Il sito attivo delle caspasi è determinato da quattro loops indicati con L1-2-3-4, distribuiti in due sub-unità (da Rastagi et al., 2009).

Le altre caspasi identificate includono la caspasi 1, 4 e 5 che sono coinvolte nei processi infiammatori, la caspasi 11 che è stata descritta come regolatrice dell'apoptosi e della maturazione delle citochine durante lo shock settico, la caspasi 12 che media l'apoptosi endoplasmatica e la citotossicità prodotta dalla proteina beta amiloide, la caspasi 13 che

sembra derivare da un gene bovino e la caspasi 14 che è altamente espressa nei tessuti embrionali e in misura minore in quelli adulti dove sembra regolare il corretto sviluppo delle cellule epiteliali (Hu et al., 1998; Nakagawa et al., 2000, Koenig et al., 2001; Kang et al., 2002).

L'apoptosi è regolata da due vie specifiche, quella intrinseca e quella estrinseca, la cui attivazione dipende dal tipo di stimolo che induce il fenomeno. Il pathway intrinseco parte dai mitocondri come conseguenza di radiazioni, danni redox e farmaci che danneggiano direttamente il DNA. Le fasi di questo pathway comprendono il cambiamento di permeabilità della membrana mitocondriale che è dovuto alla sua depolarizzazione e il conseguente rilascio di citocromo c nel citosol attraverso il cosiddetto PTPC (Permeability Transition Pore Complex). Il processo culmina con la formazione di un grosso complesso proteico, composto dalla procaspasi 9, apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) e il citocromo c, e con l'attivazione delle caspasi.

Il pathway estrinseco è attivato dall'interazione di specifici ligandi con i propri recettori di membrana detti "death receptors" perché contengono nella parte intracellulare dei "death domain" (DD). Il legame dei ligandi, quali per esempio i membri della famiglia dei recettori TNF, tra cui Fas e TNFR, con il recettore, stimola l'oligomerizzazione di questi tramite i loro DD. Successivamente i recettori legano proteine citosoliche ad attività adattatrice contenenti anch'esse un "death domain" che, mediante i propri death effector domains (DED), attivano la cascata delle caspasi che porta all'esecuzione dell'apoptosi (Lawen, 2003).

I due pathway intrinseco ed estrinseco in genere si sovrappongono, condividendo parecchie molecole sia regolatrici che effettrici.

Una deregolazione dell'apoptosi o un mal funzionamento del macchinario apoptotico può essere causa di diverse patologie umane come il cancro, le malattie neurodegenerative e i disordini autoimmuni. Questo perché la morte cellulare programmata è un meccanismo per eliminare cellule durante il normale ciclo cellulare nei vari sistemi biologici ed è quindi essenziale per il mantenimento dell'omeostasi negli organismi multicellulari.

Sono stati identificati molteplici sostanze che agiscono da induttori dell'apoptosi e sono spesso utilizzati per indurre sperimentalmente il processo di morte cellulare. Tra questi rientrano: la Staurosporina, l'Actinomicina D, il Cisplatino, la Colchicina, il Cicloesimide, la Ciclosporina A e il perossido di idrogeno. Oltre che per studiare il processo piuttosto complicato della morte cellulare programmata queste sostanze vengono saggiate farmacologicamente con lo scopo di sfruttare le loro capacità apoptotiche su cellule target come quelle tumorali.

La staurosporina: apoptosi e differenziamento

La Staurosporina è un alcaloide batterico prodotto da *Streptomyces staurospores*. È un attivatore del pathway apoptotico mediato dai mitocondri inducendo l'attivazione di canali anionici attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inibisce una varietà di chinasi (PKA, PKG, MLCK, CaMK, tirosine chinasi) e mostra selettività verso le Protein chinasi C inibendo la PKC α , la PKC β , la PKC λ , la PKC δ e la PKC ϵ . La Staurosporina inoltre inibisce la topo isomerasi II attraverso l'interazione con il sito di legame per l'ATP, aumenta l'azione dell'ornitina decarbossilasi e l'attivazione del pathway apoptotico regolato da bcl-2.

Questo alcaloide è di frequente usato in vitro per le sue capacità da un lato di agente apoptotico o pre-apoptotico e dall'altro per la sua capacità di indurre, in alcune tipologie cellulari, il differenziamento. La linea di demarcazione fra la capacità della staurosporina di differenziare le cellule e quella di indurre l'apoptosi non è ancora chiara: non si conosce, infatti, quali siano i fattori che determinano il differenziamento né quali siano le concentrazioni della sostanza in grado di provocare o il differenziamento o l'apoptosi.

La letteratura offre diversi esempi di utilizzo della Staurosporina sia con proprietà apoptotiche che nella sua capacità differenziativa.

Le proprietà apoptotiche della sostanza vengono usate, ad esempio, per simulare le condizioni di stress ossidativo che si verificano nel tessuto nervoso di pazienti con la malattia di Alzheimer. Cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, sono differenziate ed esposte per 2 ore ad un trattamento con staurosporina 100 nM. Successivamente viene valutata l'attività dell'acetilcolinesterasi che è alterata nei pazienti con Alzheimer: questa risulta

essere diminuita nelle cellule sottoposte a stress apoptotico, così come è alterata nelle patologie neurodegenerative che colpiscono la sfera cognitiva (Li et al., 2012).

Ancora viene utilizzata per studiare i livelli degli ossisteroli, prodotti di ossidazione del colesterolo, che sono spesso alterati nelle patologie neurodegenerative. Questi prodotti del colesterolo riescono infatti ad attraversare la barriera emato-encefalica e sono importanti per la regolazione dell'omeostasi del colesterolo nel sistema nervoso centrale. Hanno un impatto positivo nel cervello, inibendo la formazione della proteina beta amiloide, importante componente nello sviluppo dell'Alzheimer. Quando le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y vengono trattate con Staurosporina 30-80 nM in presenza di oxysteroli, l'induzione delle caspasi 3 e 7 provocata dalla staurosporina diminuisce grazie all'effetto neuro-protettivo mediato dagli oxysteroli (Emanuelsson et al., 2012).

È stato osservato che la Staurosporina con concentrazioni che vanno da 50 nM a 1 μ M, è capace di indurre rapidamente l'attivazione delle caspasi apoptotiche e di condurre in apoptosi varie tipologie cellulari, quali timociti immaturi, cellule T, cellule promielocitiche leucemiche (HL-60), fibroblasti e diverse linee cellulari di neuroblastoma (SH-SY5Y, NB69, IMR-5 e IMR-32) (Boix et al., 1997).

Ma all'interno di questo range di concentrazioni alcune dosi sono state usate in letteratura per differenziare tipologie cellulari differenti. Gli studi si sono concentrati principalmente su due linee cellulari: la linea PC12 derivata da feocromocitoma e la linea RGC-5 derivata da cellule gangliari della retina.

L'esposizione a basse concentrazioni di STS (10-100nM) su cellule PC12 derivate da feocromocitoma, determina dopo solo 6 ore di trattamento la crescita dei neuriti che raggiungono la loro massima lunghezza a 2 giorni di trattamento. Inoltre è evidente l'aumento della proteina Tau soprattutto all'interno delle prime due ore, raggiungendo il massimo dopo 5 ore e tornando a livelli basali dopo le 10 ore di trattamento. La proteina Tau sembra essere essenziale per stabilizzare i microtubuli e il suo incremento e i cambiamenti nelle sue isoforme sono stati osservati nello sviluppo del sistema nervoso centrale, nel differenziamento del neuroblastoma e delle cellule PC12 (Rasouly et al., 1993).

Recentemente è stato osservato che su cellule RGC-5 la Staurosporina 316 nM per 24 ore, dose che normalmente induce l'apoptosi, determina l'arresto della divisione cellulare, l'espressione di alcuni canali ionici e l'assunzione della tipica morfologia neuronale. Il soma diventa più grande e rotondeggiante e i neuriti si estendono. Questi neuriti possono essere distinti con anticorpi specifici per proteine neuronali quali Tau, GAP-43 e MAP. Tuttavia il presunto target degli inibitori delle chinasi prodotte dalla Staurosporina, che indurrebbe il differenziamento è sconosciuto. Infatti il trattamento delle cellule RGC-5 con una varietà di inibitori di chinasi da sole o in combinazione fra loro non induce i cambiamenti morfologici evidenti con la Staurosporina (Frassetto et al., 2006).

La Staurosporina ha mostrato capacità come agente induttore del differenziamento anche su cellule di neuroblastoma. Cellule SH-SY5Y trattate con Staurosporina 25nM per 72h esibiscono una morfologia neuronale differenziata, con lunghi processi simil neuritici che non si osservano nelle cellule non trattate. Questo è accompagnato da un incremento nei livelli di mRNA di GAP-43, tipico marcatore del differenziamento neuronale (Thompson and Levin, 2010).

Uno studio del 2012 testa su cellule RGC-5 diverse concentrazioni di Staurosporina per determinare quelle che differenziano da quelle che generano apoptosi. Le cellule sono trattate con STS 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM e 600 nM per 24 ore. Vengono poi valutate la morfologia, la proliferazione e la morte cellulare nonché l'attivazione delle caspasi 3 e 7, l'espressione di Bax e Bcl-2 e la presenza di alcune proteine quali NF, beta tubulina, MAP-2 e Tau. Già alla concentrazione di 50 nM si assiste alla formazione di prolungamenti simil neuritici e all'aumento dei marker NF e beta tubulina. La MAP-2 aumenta invece da concentrazioni pari a 200nM, mentre con concentrazioni superiori a 200 nM viene riscontrato l'aumento di tutti i marker citati. All'aumentare della dose di STS diminuisce in modo dose-dipendente la vitalità cellulare, il numero di cellule e la percentuale delle cellule in divisione. Gli autori del suddetto studio concludono affermando che anche a dosi di Staurosporina inferiori a 316 nM, dose consigliata in letteratura per differenziare questa linea cellulare, si ha comunque apoptosi poiché le caspasi sono attivate già con concentrazioni pari a 50 nM (Schultheiss et al., 2012).

1.9 Evoluzione

Il cariotipo dei Primati

In una moderna classificazione, l'ordine dei Primati, originati da un antenato comune durante l'Eocene circa cinquanta milioni di anni fa, comprende tre sottordini: Strepsirrhini (o Proscimmie), Tarsiiformes e Simiiformes. Gli Strepsirrhini si distinguono dagli altri primati per la conservazione di alcuni caratteri più arcaici, come il rinario umido, la mancanza di un setto retro-orbitario, il maggior sviluppo delle funzioni olfattive rispetto a quelle visive, un maggior numero di denti. Inoltre la maggior parte delle famiglie di proscimmie sono notturne. All'interno degli Strepsirrhini si trovano i Lorisiformes (galagos, lorises e pottos), i Lemuriformi (lemurs) e i Chiromyiformes (malagasy aye-aye). Le proscimmie continentali sono costituite prevalentemente da Lorisiformes, tutti notturni e presenti in regioni forestali africane e asiatiche, la cui dieta consiste principalmente di frutta e insetti.

I Lemuri (Lemuriformes) si trovano solo in Madagascar e nelle isole Comore, e rappresentano una stirpe di primati che si sono evoluti in isolamento. Sono soprattutto notturni, anche se alcune specie (in particolare *Lemur catta*) sono attive durante il giorno, o durante porzioni del giorno e della notte.

I Tarsiiformes sono unici per la loro dieta interamente faunistica; in più, sono particolarmente specializzati per uno stile di locomozione con salti. I Tarsi possono essere trovati nel Sud-Est asiatico e in Indonesia.

All'interno dei Simiiformes si trovano i Platyrrhini (Scimmie del Nuovo Mondo) e i Catarrhini che includono i Cercopithecoidea (Scimmie del Vecchio Mondo) e gli Hominoidea (umani, grandi scimmie e gibboni) (Perelman et al., 2011).

I Platyrrhini e i Catarrhini possono essere distinti in base al diverso orientamento delle narici, nei Platyrrhini le narici si aprono lateralmente, mentre nei Catarrhini si aprono anteriormente e sono dirette ventralmente.

La comparazione fra il cariotipo dell'uomo e quello delle grandi scimmie, scimpanzé, gorilla e orango, ha evidenziato la riduzione del numero cromosomico da 48 nelle grandi scimmie a 46 nell'uomo. Questa riduzione è dovuta alla presenza nell'uomo di un grande

cromosoma sub metacentrico, il cromosoma 2, che deriva dalla fusione di due cromosomi acrocentrici presenti nelle specie Pongidae elencate sopra. In particolare nello scimpanzé sarebbe avvenuta la fusione fra i cromosomi 12 e 13, mentre nel gorilla fra i cromosomi 12 e 14 (Yunis and Prakash, 1982).

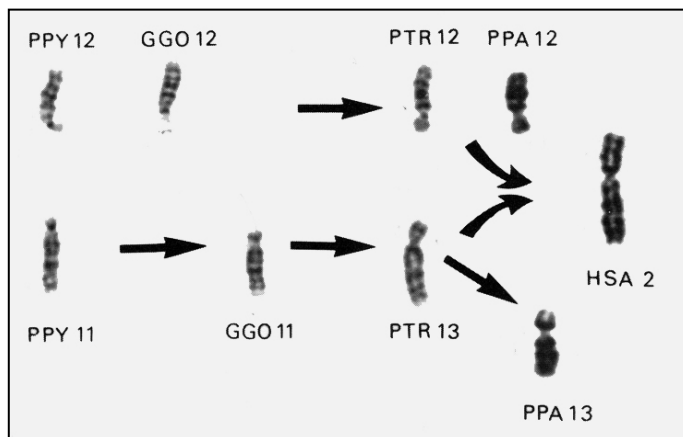


Fig. 13: Origine del cromosoma 2 umano dopo la fusione telomerica di cromosomi acrocentrici (da Seuànez, 1979).

Sono state riscontrate inoltre delle inversioni pericentriche sul cromosoma 1 e 18 e ridistribuzioni dell'eterocromatina su diversi cromosomi (Nickerson and Nelson, 1998).

Tuttavia alcune delle inversioni riscontrate confrontando i vari cariotipi sono state smentite dall'introduzione degli esperimenti di ibridazione *in situ*. Questi hanno consentito di dimostrare che in molti casi lo spostamento del centromero non è dovuto ad un'inversione ma alla formazione di neocentromeri con inattivazione di quelli vecchi.

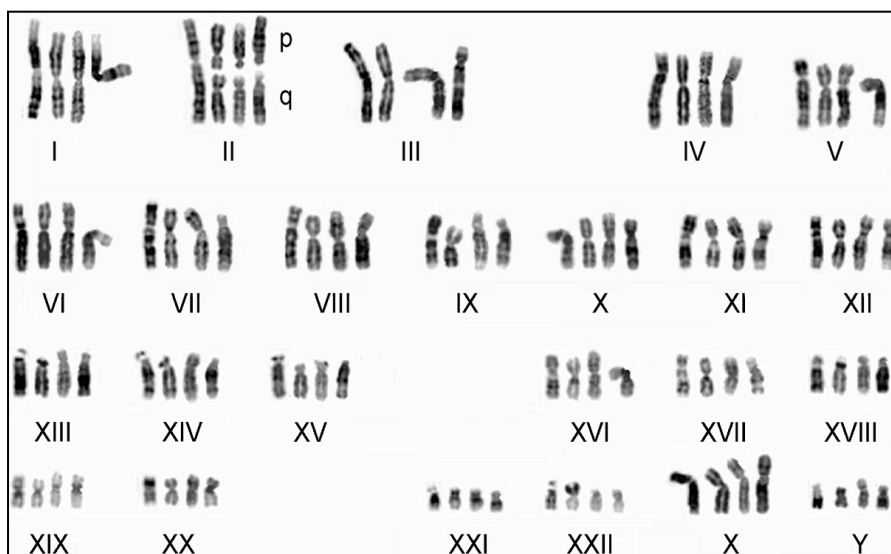


Fig. 14: Comparazione dei cariotipi di HSA (*Homo sapiens*), PPA (*Pan paniscus*), GGO (*Gorilla gorilla*) e PPY (*Pongo pygmeus*) (da Seuànez, 1979).

I primi esperimenti di comparazione dei cromosomi condotti con metodiche di FISH utilizzando sonde painting hanno evidenziato che i Primati avevano un cariotipo ancestrale di $2n=50$ (Muller et al., 1999) e alcuni di questi cromosomi si sono conservati durante l'evoluzione, come il cromosoma X. Ma con sonde di tipo painting non è possibile analizzare l'ordine dei singoli loci di un cromosoma ed evidenziare eventuali riarrangiamenti intracromosomici. Si è reso perciò necessario l'utilizzo di sonde BAC che hanno consentito di definire in modo specifico i rapporti di sintenia tra i cromosomi umani e gli omologhi negli altri Primati.

Evoluzione del cromosoma 7

La ricostruzione delle origini del cromosoma 7 umano è stato oggetto di diversi studi per più di vent'anni. La citogenetica molecolare ha permesso di affermare che esiste una forma ancestrale del cromosoma 7, trovato nei mammiferi Euteri, che comprende un piccolo cromosoma sub metacentrico composto da parte del cromosoma 7 umano (7b) e da materiale del cromosoma 16p, e un grande cromosoma acrocentrico mostrandone omologia solo con una parte del cromosoma 7 umano (7a). Alcuni autori ritengono che il cariotipo ancestrale dei primati comprendesse i due cromosomi separati: il 7a e il 7b/16p.

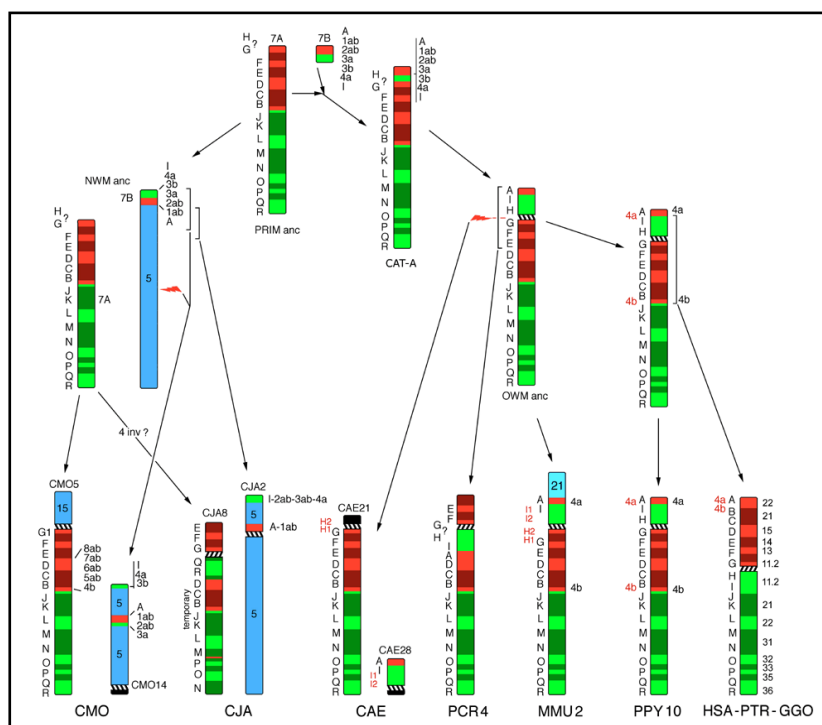


Fig. 15 : Storia evolutiva del cromosoma 7 umano. I segmenti di colore rosso e verde corrispondono, rispettivamente, al braccio corto e al braccio lungo del cromosoma 7 umano. Le lettere sulla sinistra dei cromosomi indicano specifici loci localizzati mediante FISH di cloni BAC.

Precedentemente alla divisione dei primati in Anthropeida e Prosimii sarebbe avvenuta la fissione del 7b e del 16p e successivamente una fusione 7b/5 nella discendenza che porta ai Primati del Nuovo Mondo e una fusione 7a/7b nei Primati del Vecchio Mondo (Richard et al., 2000).

Mediante bandeggio G ed R è stata messa in evidenza che il cromosoma 7 umano e il suo omologo nello scimpanzé presentano un pattern di bande molto simile. Questo differisce però da quello riscontrato nell'omologo del gorilla per la presenza di una inversione paracentrica con breakpoint sul braccio lungo a livello della banda 7q11.23 e 7q22.1. La morfologia del cromosoma 7 trovato nel gorilla suggerirebbe che esso rappresenti uno stato intermedio nell'evoluzione dei Primati. Inoltre una inversione pericentrica con breakpoint sul 7p22.1 e il 7q22.1 è stata riscontrata negli antenati delle grandi Scimmie Africane e dell'uomo. Questi quattro breakpoint sono tutti fiancheggiati larghi segmenti di duplicazione (Clemente et al. 1990).

Un lavoro del 2004 condotto da Muller e collaboratori, analizza 19 sonde BAC su cariotipi provenienti da specie diverse di Primati. I 19 loci studiati mappano sul cromosoma 7 ad intervalli di 5-10 Mb. L'uomo e lo scimpanzé hanno mostrato lo stesso ordine dei 19 loci mentre nel gorilla l'ordine dei loci 11-13 è risultato invertito, indicando la presenza di un'inversione paracentrica con breakpoint fra le coppie di BAC 10/11 e 13/14. Inoltre gli esperimenti di FISH hanno dimostrato che nell'orango e nel gibbono l'ordine sequenziale dei BAC 3-13 è invertito rispetto all'omologo del gorilla, indicando che è avvenuta un'inversione pericentrica con punti di rottura negli intervalli fra le coppie BAC 2/3 e 12/13 (Muller et al., 2004).

In uno studio del 2008 sono stati analizzati varie regioni del cromosoma 7 e paragonate fra l'uomo e altre specie di Primati non umani. Le regioni scelte erano due nel braccio corto, due nel braccio lungo e una regione pericentromerica. Le regioni selezionate nel braccio corto corrispondono alla banda HSA7p22.3 molto ricca in GC e alla banda 7p21.3 che al contrario della precedente è povera in GC. Queste due bande conservano la loro posizione nel cromosoma omologo di GGO mentre si separano in MMU, in PCR e in CJA dove addirittura si ritrovano in cromosomi differenti. Le regioni studiate a livello del braccio lungo (7q36.1 e 7q36.2) si trovano in corrispondenza della

porzione telomerica e rimangono contigue e telomeriche in tutte le specie studiate ad eccezione di CJA dove pur rimanendo contigue si posizionano vicino al centromero del cromosoma 5 (Federico, 2008).

Gli studi per definire le regioni coinvolte nei riarrangiamenti avvenuti durante l'evoluzione dei Primati sono stati e sono ancora oggi molteplici poiché si tenta di definire le strutture geniche o l'espressione di quali geni contribuisce all'unicità della specie umana. Infatti i riarrangiamenti hanno un impatto importante sull'attivazione e sulla regolazione genica, fattore che potrebbe avere un ruolo significativo sull'isolamento riproduttivo fra le specie ominoidi.

2. Materiali e metodi

2.1 Colture cellulari

Coltura di linfociti da sangue periferico

I piccoli linfociti T presenti nel sangue sono cellule in cui si può indurre attività mitotica in vitro mediante l'aggiunta al mezzo di coltura di fitoemoagglutinina (PHA), una sostanza capace di trasformare entro alcune ore questi elementi cellulari in blasti, cellule con attività proliferativa. I linfociti, che possono essere reperiti con un semplice prelievo venoso, vengono generalmente tenuti in coltura per 72 ore e poi processati per ottenere preparati cromosomici in 2D o in 3D o ancora utilizzati al momento del prelievo per estrazione di RNA o DNA.

Protocollo per l'allestimento delle colture da sangue periferico

- Aggiungere sterilmente il sangue intero, contenente 5000 UI/ml di eparina, con rapporto 1/10 al terreno RPMI 1640 addizionato del 20% di siero fetale bovino, l' 1% di L-Glutamina, l' 1% di antibiotico Penicillina/Streptomomicina e il 3% di fitoemoagglutinina
- Collocare la coltura in incubatore a 37°C per 72 ore

Allestimento di preparati cromosomici da sangue periferico

Negli ultimi 90 minuti di coltura viene aggiunta la colchicina che consente il blocco dei cromosomi in metafase inibendo la polimerizzazione dei microtubuli. Così viene impedita la formazione del fuso mitotico bloccando le cellule in fase M. Le cellule vengono quindi trattate con ipotonica, che determina il rigonfiamento e la rottura delle membrane cellulari, e il fissativo di Carnoy, che stabilizza i cromosomi e rende più duraturo il preparato ritardando l'azione degli agenti ossidanti. Il preparato viene poi strisciato su un vetrino e colorato.

Protocollo per la preparazione cromosomica

- Dopo circa 72 ore di incubazione (48 o 92 se necessario) agitare leggermente la coltura e aggiungere 0,05 µg/ml di Colcemid. Agitare nuovamente e mantenere

in incubatore da mezzora ad un'ora a seconda delle esigenze

- Centrifugare la coltura per 10 minuti a 1100 rpm
- Aspirare il sovrinatante facendo attenzione a non eliminare anche la parte del pellet cellulare
- Spezzare il pellet e aggiungere la soluzione ipotonica KCl 0,075 M, goccia a goccia
- Mantenere le cellule in soluzione ipotonica per 30 minuti
- Centrifugare a 1100 rpm per 10 minuti
- Scartare il sovrinatante, spezzare il pellet e dispensare, goccia a goccia, il fissativo freddo alcool metilico/acido acetico (3:1)
- Mantenere le cellule in fissativo per 30 minuti
- Centrifugare a 1100 rpm per 10 minuti
- Aspirare il sovrinatante, spezzare in pellet e aggiungere nuovamente il fissativo.
- Centrifugare a 1100 rpm per 10 minuti
- Conservare il preparato a -20 o procedere con lo striscio sul vetrino scartando il sovrinatante e aggiungendo alcune gocce di fissativo fresco tenendo conto che la quantità di gocce da aggiungere dipende dalla concentrazione delle cellule nel pellet

Allestimento del vetrino per bandeggio G

- Porre qualche goccia di preparato sul vetrino portaoggetto
- Passare rapidamente alla fiamma
- Colorare il vetrino con Giemsa al 5%

Separazione dei linfociti da sangue periferico

Mediante l'utilizzo della soluzione LSM (Lymphocyte Separation Medium) il sangue eparinizzato o defibrinato è diluito con soluzione fisiologica in rapporto 1:1 e posto al di sopra della soluzione LSM (che contiene 6,2 g Ficoll e 9,4 g di diatrizoato di sodio per 100

ml). Dopo opportuna centrifugazione, grazie ad una migrazione differenziale delle varie componenti del sangue su più strati, è possibile isolare i linfociti: il pellet che si forma sul fondo della provetta è formato da eritrociti e granulociti che migrano attraverso il gradiente. Per la loro densità, invece, i linfociti e le altre cellule mononucleate, piastrine e monociti, si trovano fra l'interfaccia formata fra LSM e il plasma. Con lavaggi successivi vengono poi rimossi piastrine e residui di plasma e i linfociti possono così essere utilizzati per le procedure necessarie, quali estrazione di DNA o RNA, oppure posti in coltura con terreno specifico.

Protocollo

- Preparare una provetta sterile contenente eparina (3 µl/ml) ed introdurre il sangue appena prelevato
- Miscelare completamente la soluzione LSM invertendo delicatamente la bottiglia
- Mettere 3 ml di LSM in una provetta sterile
- Miscelare 2 ml di sangue eparinizzato con 2 ml di soluzione fisiologica
- Introdurre delicatamente il sangue diluito sopra i 3 ml di LSM nella provetta sterile creando una interfaccia sangue-LSM; far attenzione a non miscelare il sangue con LSM
- Centrifugare a 1400 rpm a temperatura ambiente per 30 minuti (con la centrifugazione gli eritrociti e i granulociti sedimentano, mentre i linfociti e altre cellule mononucleari, come monociti e piastrine, si trovano sopra lo strato di LSM, nell'interfaccia plasma-LSM)
- Aspirare lo strato di plasma fino a 2-3 mm sopra lo strato di linfociti
- Aspirare lo strato di linfociti più circa la metà dello strato di LSM sottostante e trasferirlo in una nuova provetta sterile
- Aggiungere un ugual volume di PBS 1X sterile alla sospensione con i linfociti e centrifugare per 10 minuti a temperatura ambiente (18-25 °C) ad una velocità sufficiente a far sedimentare i linfociti senza danneggiarli (1200 rpm per 10 min)
- Fare un altro lavaggio con PBS 1X e procedere con la procedura di interesse

Colture di cellule stabilizzate

Una coltura cellulare stabilizzata deriva da cellule provenienti da un organo o da un tessuto specifico ed è in grado di replicarsi indefinitamente e di mantenersi, così, vitale per moltissimi cicli mitotici. Le cellule possono crescere in monostrato, adese ad un supporto, o in sospensione se non necessitano di tale adesione. Le cellule in monostrato crescono occupando tutto lo spazio a disposizione finchè non raggiungono la confluenza. In questo caso, per mantenere la coltura vitale, è necessario staccare le cellule dal supporto e diluire la coltura.

Nella presente tesi sono state utilizzate diverse linee cellulari stabilizzate:

- La linea SK-N-BE
- La linea GDM-1
- Diverse linee cellulari di Primati non umani

Linea cellulare SN-K-BE

La linea cellulare di neuroblastoma SN-K-BE cresce in monostrato a 37°C con il 5% di anidride carbonica in terreno RPMI 1640 addizionato del 10% di siero fetale bovino, l'1% di antibiotico Penicillina/Streptomicina e l'1% di L-glutamina.

Linea cellulare GDM-1

Le cellule della linea GDM-1 crescono singole in sospensione in RPMI 1640 addizionato del 20% di FBS (Fetal bovin serum), l'1% di P/S (Penicillin/Streptomycin) e l'1% di L-glutamina; vengono poi poste in incubatore a 37°C con il 5% di CO₂.

Linee cellulari di Primati

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate sei linee cellulari linfoblastoidi di sei diverse specie di Primati: GGO5 (Gorilla gorilla), PTR7 (Pan troglodytes), MMU2 (Macaca mulatta), PPY9 (Pongo pigmeus), PCR1 (Presbytis cristata), PTR7 (Pan troglodytes).

Tutte queste linee crescono in sospensione in terreno RPMI 1640 con il 20% di siero fetale bovino, l'1% di L-glutamina e l'1% di antibiotico Penicillina/Streptomicina. Le cellule crescono in incubatore a 37°C in presenza del 5% di CO₂.

Preparazione dei nuclei in interfase e dei cromosomi in 2D dalle linee cellulari

Quando le cellule sono in fase replicativa viene aggiunto alla coltura il colcemid alla concentrazione di 0,05 µg/ml. Le cellule vengono riposte in incubatore da un'ora a due ore. Trascorso questo tempo le cellule vengono processate con soluzione ipotonica KCl 0,075 M e fissativo di Carnoy (Metanolo/Acido acetico in rapporto 3:1). I preparati così ottenuti possono essere conservati a -20°C per lunghi periodi oppure vengono strisciati su vetrino per la colorazione con bandeggio G o per l'ibridazione in situ fluorescente.

Immunofluorescenza su cellule in monostrato o in sospensione

L'immunofluorescenza è una tecnica che si basa sulla capacità di un anticorpo primario di riconoscere un antigene specifico con alta affinità, e che permette perciò di localizzare con facilità una proteina d'interesse. Il campione da analizzare, posto o cresciuto su un vetrino, come avviene per le colture cellulari, viene fissato con paraformaldeide per preservarlo e stabilizzarlo mantenendo così inalterata l'organizzazione strutturale. Successivamente avviene una fase di permeabilizzazione, effettuata con solventi organici e detergenti, per permettere l'accessibilità dell'anticorpo all'epitopo antigenico intracitoplasmatico. Dopo avere bloccato siti aspecifici a cui si possono erroneamente legare gli anticorpi si procede all'incubazione con anticorpo primario e secondario e infine alla visualizzazione del segnale al microscopio a fluorescenza o confocale.

Protocollo per l'immunofluorescenza su colture cellulari

- Lavare le cellule, cresciute su vetrino o poste su di esso mediante citocentrifuga, in PBS 1x
- Fissare con fissativo pFA 4% in PBS 1x per 20' a RT (~ 25 ml)
- Lavaggio con glicina 10 mM in PBS 1X 2 x 5' a RT (~ 25 ml)
- Permeabilizzazione con TRITON 0,5% in PBS 1X per 15' RT (~ 25 ml)
- Incubare in 100 µl di blocking solution per 20' a RT (con vetrino coprioggetto)
- Sgocciolare senza asciugare e incubare le cellule per 1h a 37 °C con 100 µl di anticorpo primario (in blocking solution)
- Lavaggio 2x5' con PBS-Tween a 37 °C

- Incubare per 1h a 37 °C in camera umida con 100µl di anticorpo secondario in blocking solution
- Lavaggio 2x5' con PBS-Tween 0,2% a 37 °C
- Deidratare in alcool 70% 85% 95% 1x5' cad.
- Asciugare i vetrini all'aria
- Colorare con DAPI
- Fissare il coprioggetto con il rubber cement

2.2 Ibridazione in situ fluorescente

La FISH è una tecnica di ibridazione che permette di localizzare sequenze specifiche negli acidi nucleici. Il DNA dei cromosomi viene messo a contatto con una “sonda specifica” ovvero un frammento di DNA, la cui sequenza è complementare al segmento cromosomico che interessa evidenziare. Questa sonda “riconosce”, se presente, il frammento complementare, si lega a quel segmento, e si fa a sua volta riconoscere perché “marcata” da una molecola indicatrice (in genere biotina o digossigenina). Dopo l’ibridazione e il lavaggio per rimuovere l’eccesso di sonda, il preparato cromosomico viene incubato con una soluzione contenente una molecola dotata di fluorescenza, che si lega all’indicatore della sonda ibridata. È così possibile individuare i segnali sfruttando la luce di fluorescenza emessa a una precisa lunghezza d’onda, avvalendosi di un microscopio dotato di appositi filtri.

Preparazione delle sonde

Per l’ibridazione in situ fluorescente sono state utilizzate sonde PAC e BAC estratte da cloni batterici di E. Coli. I batteri vengono inizialmente piastrati e le colonie singole cresciute in piastra vengono messe in coltura in terreno liquido LB (Luria Broth) con antibiotico specifico per una notte a 37°C con agitazione. Dopo 16 ore si procede alla centrifugazione della coltura e all’estrazione del vettore contenente la sonda utilizzando uno specifico Kit commerciale (Qiagen). Il kit consente la lisi della cellula batterica, la separazione del vettore-sonda dal DNA genomico, l’eliminazione dei residui della lisi e infine l’eluizione della sonda.

Preparazione del terreno e semina dei batteri

- Per preparare il terreno liquido per la coltura batterica è necessario sciogliere 25 gr di LB in un litro d’acqua distillata
- Sterilizzare il terreno in autoclave
- Aggiungere l’antibiotico specifico (per i BAC cloramfenicolo 12,5 µg/ml e per i PAC

kanamicina 30 µg/ml)

- Prelevare una colonia dalla piastra precedentemente strisciata e inoculare in 5 ml di terreno liquido LB
- Porre la coltura a 37°C overnight con agitazione (220 rpm)

Estrazione del DNA (Kit Qiagen)

- Centrifugare la coltura a 2500 rpm per 30 minuti
- Risospendere il pellet in 300 µl di P1 (soluzione di risospensione) e travasare in una eppendorf
- Aggiungere 300 µl di P2 (soluzione di lisi); agitare delicatamente invertendo la eppendorf 5 volte, non vortexare
- Incubare per 5 minuti a T.A.
- Aggiungere 300 µl di P3 (soluzione di precipitazione); agitare subito delicatamente, invertendo l'eppendorf 5 volte; non vortexare e incubare 5 minuti in ghiaccio; prima di centrifugare miscelare nuovamente la sospensione
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti
- Equilibrare la colonna con 1 ml di buffer QBT
- Inserire il sovrantante nella colonnina
- Lavare la colonnina con 2x2 ml di buffer QC
- Eluire il DNA con 800 µl di buffer QF preriscaldato a 65°C, da porre al centro della colonnina
- Raccogliere l'eluato in una eppendorf
- Precipitare il DNA aggiungendo 0,7 volumi di isopropanolo a 4°C
- Miscelare e centrifugare immediatamente per precipitare (a 12000 rpm per 30 minuti)
- Lavare il pellet con 1 ml di etanolo 70%, centrifugare a 10000 rpm per 10 minuti e risospendere in T.E.

Marcatura del DNA sonda

Il metodo si basa sull'incorporazione enzimatica di molecole con proprietà antigeniche, gli apteni, coniugati a deossinucleotidi trifosfati. La biotina e la digossigenina coniugati con dUTP sono fra gli apteni più utilizzati. Questi nucleotidi modificati vengono incorporati nel DNA sonda mediante reazioni enzimatiche di nick translation. Una DNase produrrà delle rotture del legame fosfodiesterico (nick) tra le basi della doppia elica e successivamente la DNA polimerasi sintetizzerà, utilizzando come stampo la sonda d'interesse, un filamento complementare che conterrà anche i nucleotidi coniugati proprio con gli apteni.

Procedura

- Mettere la quantità opportuna di DNA da marcare (500-1000 ng) in una eppendorf, portando ad un volume finale di 16 μ l
- Aggiungere 4 μ l di miscela di marcatura presente nel kit Nick Translation (Roche), con un volume finale di reazione di 20 μ l
- Incubare a 15°C per 90 minuti
- Bloccare la reazione con 1 μ l di EDTA 0,5 M a pH8
- Incubare a 65°C per 10 minuti
- Aggiungere il DNA carrier (Yeast tRNA 25 mg/ml; Salmon sperm 10 mg/ml) 50x rispetto alla quantità di DNA marcato
- Precipitare il DNA aggiungendo sodio acetato 3M (1/10 del volume finale) ed etanolo 100% (2,5 volumi)
- Incubare a -20°C overnight
- Centrifugare a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C
- Aspirare il soprannatante
- Fare asciugare il pellet e risospingere nella miscela di ibridazione (50% formammide/2XSSC/10% destran solfato/50 mM tampone fosfato, pH 7,0) alla concentrazione di 50 ng/ μ l

FISH

Pretrattamento dei cromosomi

- Mettere sul vetrino coprioggetto 24x50 100 µl di RNasi 100 µg/ml in 2xSSC pH 7,0 e incubare a 37° C per 1h in camera umidificata con H₂O
- Lavare 2x5' in 2xSSC con agitazione
- Lavare 1x5' in PBS 1X con agitazione
- Incubare 10' in formaldeide 1% (formaldeide 37%/ PBS 10X/ MgCl₂ 1M/ H₂O bidistillata)
- Lavare 2x5' in PBS 1X a T.A. con agitazione
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1x5' cad.
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria

Procedura

- Un paio d'ore prima della denaturazione dei cromosomi porre la sonda a 37° C, agitando e spinnando ripetutamente in modo da farla sciogliere bene
- Aggiungere alla quantità opportuna di sonda scelta il HCot1 (5 µg/ µl); raggiungere un volume finale di 10 µl aggiungendo la miscela di ibridazione (50% formammide, 2XSSC, 10% destran solfato, 50mM Tampone fosfato pH 7,0)
- Porre a 37°C per altri 15 minuti
- Denaturare a 82° C per 8 minuti al termoblock
- Mettere in ghiaccio un minuto, centrifugare qualche secondo e incubare 1 h e 30' a 37° C per il preanniling delle sequenze ripetute
- Denaturare i cromosomi incubandoli a 72° C per 2,5 minuti in 100 µl di miscela di denaturazione (70% formammide, 2XSSC, 50 mM Tampone fosfato ph 7,0)
- Sciacquare brevemente in 2XSSC a 4°C
- Deidratare in etanolo 70% freddo 2x3 minuti, poi in etanolo all' 85% per 3 minuti e successivamente in etanolo al 95% per 3 minuti
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria
- Mettere sul vetrino la sonda (10 µl), coprire con il coprioggetto 18x18 e sigillare

con il rubber cement

- Incubare i vetrini a 37° C per 16 ore in camera umidificata

Rilevazione del segnale

Reagenti necessari

- Blocking 1x: diluizione 1:10 dello stock blocking solution in PBS1X
- Soluzione di lavaggio: 0,2 % Tween 20 in PBS1X (PBS-Tw)
- Avidina Texas-red 1:800 in 4M (5 µg/ml)
- Anticorpo anti-avidina biotinilato 1:100 in 4 M (0,5 µg/ml)
- Anticorpo 1 : anticorpo monoclonale anti-Dig prodotto nel topo, diluire 1 µl dello stock in 500 µl di blocking solution 1X
- Anticorpo 2: Anti-IgG di topo coniugato FITC prodotto nel coniglio, diluire 1 µl dello stock in 700 µl di blocking solution 1X
- Anticorpo 3: Anticorpo monoclonale anti-Ig di coniglio coniugato FITC prodotto in topo; diluire 1 µl dello stock in 100 µl di blocking solution 1X
- DAPI 1,5 µg/ml in Vectashild
- 2XSSC
- PBS1X
- 4T: 4XSSC/ Tween 0,05%
- Alcool 70%, 85%, 95%
- 4M: latte in polvere 5% / 4XSSC

Procedimento per rilevazione digoxigenina + biotina

- Lavare in 2XSSC a 37° C fino alla caduta del coprioggetto
- Lavare 3x10 minuti in 0,1xSSC a 60°C
- Lavare per 5 minuti in 4T
- Incubare per 30 minuti in camera umida a T.A. con 100 µl di 4M
- Lavare per 5 minuti in 4T
- Incubare per 30 minuti con 100 µl di avidina Texas-red in camera umida a 37°C

- Lavare per 5 minuti in 4T
- Lavare in 2x5 minuti in PBS-Tw a 37°C
- Incubare per un'ora a 37°C in camera umida con 100 µl di anticorpo 1 in blocking solution e con 1 µl di anticorpo anti avidina biotinilato
- Lavare 3x5 minuti con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl di anticorpo 2 in blocking solution e avidina Texas-red
- Lavare 3x5 minuti con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Incubare per un'ora a 37° C in camera umida con 100 µl di anticorpo 3 in blocking solution
- Lavare 3x5 minuti con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% per 5 minuti cad. e lasciare asciugare i vetrini all'aria
- Colorare e fissare il coprioggetto con il rubber cement

Procedura per rilevazione sonde marcate con biotina

- Lavare in 2X SSC a 37°C fino alla caduta del coprioggetto
- Lavare 3 x 10 min in 0,1X SSC a 60°C
- Lavare 1 x 5' in 4T con agitazione
- Incubare 30 minuti con 100 µl per vetrino di 4M in camera umidificata a T.A.
- Lavare 1 x 5 minuti in 4T con agitazione
- Incubare per 30 min a 37°C in camera umidificata con 100 µl per vetrino di Avidina FITC o Texas-Red in 4M
- Lavare 3 x 5 min in 4T con agitazione
- Incubare per 30 minuti a 37°C in camera umidificata con 100 µl per vetrino di anticorpo anti-avidina biotinilato
- Lavare 3 x 5 minuti in 4T con agitazione
- Incubare per 30 minuti a 37°C in camera umidificata con 100 µl di Avidina FITC o Texas-Red in 4M
- Lavare 3 x 5 minuti in 4T con agitazione

- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5 minuti cadauno
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria
- Colorare i vetrini con DAPI (25 µl per vetrino)
- Fissare il coprioggetto con il rubber cement

Procedura per rilevazione sonde marcate con digoxigenina

- Lavare in 2X SSC a 37°C fino alla caduta del coprioggetto
- Lavare 3 x 10 minuti in 0,1X SSC a 60°C
- Lavare 1 x 5 minuti in PBS 1X con agitazione
- Incubare per 30 minuti con 500 µl di blocking solution in camera umida a T.A.
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl per vetrino di anticorpo 1 in blocking solution
- Lavare 3 x 5 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl per vetrino di anticorpo 2 in blocking solution
- Lavare 3 x 5 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl per vetrino di anticorpo 3 in blocking solution
- Lavare 3 x 5 minuti con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5 minuti cadauno
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria
- Colorare i vetrini con DAPI (25 µl per vetrino)
- Fissare il coprioggetto con il rubber cement da ambo i lati

3D FISH

- Fare crescere le cellule sul vetrino o porle su di esso mediante citocentrifuga
- Fare un lavaggio con PBS1X
- Fissare con fissativo pFA 4%/PBS1X per 20' a RT (~ 25 ml)
- Fare un lavaggio con PBS1X
- Permeabilizzare con 0,5% TRITON X-100 in PBS per 20' RT (~ 25 ml)

- Lavare in 20% glicerolo/PBS per 30 min
- Eseguire da 3-5 cicli di raffreddamento in azoto liquido
- Lavare in PBS 1X
- Porre in HCl 0,1 M per 5 minuti

A questo punto si può procedere con la FISH facendo subito la RNasi oppure i vetrini si possono conservare in 50%/formammide/2XSSC a 4°C.

Localizzazione intranucleare bidimensionale

Mediante un software specifico, MacProbe v4.3, vengono raccolte le immagini dei nuclei contenenti i segnali di ibridazione per uno specifico locus ottenuti attraverso esperimenti di ibridazione in situ 2D o 3D. Questi segnali vengono successivamente analizzati con un ulteriore software, appositamente sviluppato nel laboratorio di Genetica del Dip. di Scienze biologiche, geologiche ed ambientali dell'Università di Catania, che permette di assegnare un valore numerico, compreso fra zero e uno, ai vari segnali di ibridazione. Il valore 0 corrisponde al centro del nucleo mentre il valore 1 alla periferia. Per assegnare ad un locus specifico una determinata localizzazione nucleare radiale vengono analizzati almeno 300 nuclei e viene valutata statisticamente la mediana \pm l'intervallo di confidenza (CI). I dati provenienti da un grande numero di sonde localizzate su vari cromosomi in diversi esperimenti, hanno permesso di stabilire che valori di mediana più bassi di 0,65 indica loci localizzati più internamente al nucleo mentre valori di mediana superiori allo 0,65 indicano loci più periferici.

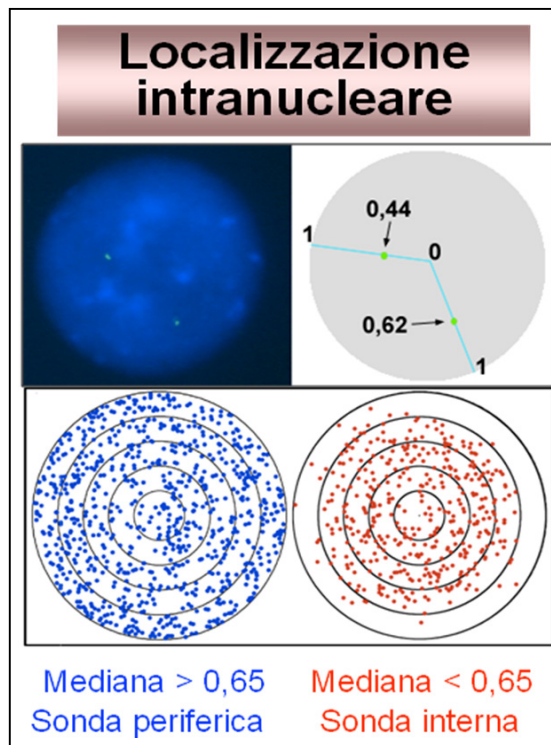


Fig. 16: Localizzazione nucleare radiale mediante analisi bidimensionale. In alto un sempio di un nucleo ibridato con sonda puntiforme e i suoi relativi valori di mediana.

In basso, distribuzione di un elevato numero di segnali d'ibridazione, localizzati nei nuclei in interfase, relativi a una sonda che si trova in una posizione periferica del nucleo e di un'altra localizzata più internamente al nucleo.

2.3 REAL-TIME PCR

La real time PCR è una tecnica che consente facilmente di studiare l'espressione genica in modo rapido, accurato e sensibile stabilendo i livelli di mRNA nei campioni biologici d'interesse. La quantificazione dei prodotti di PCR viene rilevata ad ogni ciclo di amplificazione mediante l'emissione di un segnale di fluorescenza che riflette la quantità iniziale di mRNA. L'approccio della quantificazione relativa, la più utilizzata negli studi di espressione, determina la quantità di mRNA target nel campione di interesse normalizzando i valori con uno o più controlli interni (ACTB, GAPDH, etc). Per ogni esperimento in quantificazione relativa sono necessari:

- GENE TARGET, cioè la sequenza di DNA da analizzare caratterizzata dall'utilizzo di primer specifici
- CALIBRATORE, ovvero il campione di riferimento da utilizzare per l'analisi comparativa, ad esempio un campione non trattato o un campione al giorno zero nel caso si stia testando l'effetto di una specifica sostanza per più giorni
- CONTROLLO ENDOGENO, un gene house keeping espresso costitutivamente in tutti i campioni analizzati

Per l'analisi dei dati viene utilizzato il C_t , ovvero il numero del ciclo di amplificazione in cui il segnale della fluorescenza incontra la linea di threshold cioè il livello di segnale che presenta un significativo incremento rispetto all'emissione dei primi cicli di amplificazione considerati "rumore di fondo". Dapprima viene normalizzato il valore del C_t del gene target con quello del controllo endogeno scelto ottenendo il ΔC_t dalla differenza $C_{t \text{ gene interesse}} - C_{t \text{ controllo}}$. Successivamente viene ottenuto il $\Delta\Delta C_t$ normalizzando il ΔC_t del campione di interesse con quello del calibratore. Infine viene applicata la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ per determinare la concentrazione relativa del gene target nel campione di interesse.

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è il primo step per studiare l'espressione di un gene mediante real time PCR. Per fare ciò è stato utilizzato il TRI Reagent (Sigma) che è una mistura di guanidina tiocianato e fenolo in una soluzione monobasica e l'estrattore automatizzato (MagCore).

Il TRI Reagent è in grado di estrarre DNA, RNA e proteine dall'omogenizzazione o dal lisato di un campione di tessuto umano, animale, vegetale, di lievito, batterico e virale. Dopo l'aggiunta di cloroformio alla miscela di TRI Reagent e del campione cellulare e dopo una opportuna centrifugazione la miscela si separa in tre fasi, una fase acquosa che contiene l'RNA, l'interfase che contiene DNA e la fase sedimentata che contiene le proteine.

Con l'estrattore automatizzato, invece, si parte da un numero noto di cellule che vengono risospese in un buffer di lisi contenente beta-mercaptoetanololo. I campioni così preparati vengono inseriti negli appositi rack insieme ad una provetta contenente DNase, per l'eliminazione del DNA genomico, e le cartucce specifiche per la tipologia di estrazione. L'estrazione dell'RNA avverrà poi mediante separazione con biglie magnetiche ed eluizione del campione in apposite provette.

Protocollo per estrazione con TRI Reagent

- Risospendere il pellet cellulare da cui si vuole estrarre l'RNA in 1 ml di TRI Reagent
- Omogenizzare e incubare qualche minuto a T.A.
- Aggiungere 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRI reagent utilizzato
- Vortexare 20 secondi e incubare da 2 a 15 minuti finchè non si osserva la separazione delle fasi
- Centrifugare 12000 rpm per 15 minuti. Al termine della centrifugazione si saranno separate le tre fasi: la fase acquosa trasparente (RNA), l'interfase (DNA) e la fase organica che comprende proteine e lipidi.
- Raccogliere la fase acquosa ed aggiungere un ugual volume di isopropanolo
- Conservare a -20°C overnight se si vuol procedere con la precipitazione l'indomani
- Centrifugare a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C
- Scartare il soprannatante ed aggiungere 1 ml di Etanolo 70% al pellet di RNA
- Scartare il soprannatante, fare evaporare tutto l'etanolo e risospendere in acqua DEPC alla concentrazione voluta

Protocollo per estrazione RNA con estrattore automatico

- Contare le cellule, prenderne un volume appropriato (500.000-1.000.000 di cellule) e trasferirlo nel sample tube
- Centrifugare 5 minuti a 1400 rpm
- Scartare il sopranatante e spezzare il pellet
- Aggiungere 200 µl di RB buffer contenente β-ME (10 µl/ml) al pellet cellulare e miscelare attraverso il vortex;
- Porre il campione nel 4° posto del rack;
- Sistemare l'Elution Tube, il puntale e la cartuccia negli appositi alloggiamenti del macchinario;
- Porre il tubo con la DNase nel 3° posto del rack (per preparare la DNase I: aggiungere 10 µl di DNase I con 190 µl di DNase reaction buffer 1X) (10 unità di DNase I per campione)
- Impostare i parametri della corsa sul macchinario

Protocollo generale per real time PCR quantitativa

(SuperScript® III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit, Invitrogen)

Il SuperScript® III Platinum® SYBR Green One-Step qRT-PCR è un kit specifico per effettuare reazioni di RT-PCR quantitativa in un unico step. Il kit infatti contiene l'enzima per effettuare la trascrittasi inversa, la Taq Polimerasi e una mix contenente buffer, SYBR Green, MgSO₄ e dNTPs. Sia la reazione di sintesi del cDNA che la PCR sono effettuati in un'unica provetta usando primer gene-specifici e un campione di RNA totale o mRNA. Quando viene prodotto il DNA a doppio filamento il SYBR Green, agente intercalante, si lega alla doppia elica e il segnale fluorescente prodotto, proporzionale alla concentrazione di mRNA iniziale, viene rilevato dallo strumento di real time.

Ciclo standard

La mix di reazione viene preparata in ghiaccio miscelando le varie componenti nelle seguenti proporzioni:

SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix	0,4 µl
2XSYBR® Green Reaction Mix	10 µl
Forward primer, 10µM	0,4 µl
Reverse primer, 10µM	0,4 µl
Template (1pg – 1 µg RNA totale)	1-2 µl
H₂O DEPC	Fino a 20 µl

Programma per un ciclo standard su STEP ONE (Applied Biosystem)

- 50°C per 3 minuti per la sintesi del cDNA
- 95°C per 5 minuti
- 40 cicli di:
 - 95°C per 15 secondi
 - 60°C per 30 secondi
- 40°C per 1 minuto
- Segue curva di Melting da impostare sullo strumento

2.4 RT-PCR in situ

La RT-PCR in situ è una tecnica permette la rilevazione di mRNA direttamente su cellule o su tessuti. Le cellule vengono dapprima fissate per preservarne la struttura 3D e trattate con Proteinase K. Successivamente la sequenza di mRNA viene usata per creare un filamento complementare di DNA (cDNA) mediante retro-trascrizione. Quest'ultimo viene poi amplificato mediante una classica reazione di PCR con nucleotidi a marcatura diretta o indiretta, colorato e poi osservato al microscopio a fluorescenza o confocale.

Protocollo

- Le cellule vengono fatte crescere su vetrino o poste su di esso mediante citocentrifuga
- Lavare le cellule in PBS1X
- Fissare in pFA 4% in PBS 1X per 3 ore
- Lavare in PBS 1X
- Porre sul vetrino la Proteinase K 2 µg/ml in 0,1M Tris-HCl pH7.5 e 5mM EDTA per 10 minuti
- Lavare in PBS1X
- Porre in Etanolo 96% per 1 minuto e lasciare asciugare il vetrino all'aria
- Aggiungere sul vetrino la mix per la retro-trascrizione (High capacity RNA-to-cDNA kit, Invitrogen)
- Incubare la reazione a 37°C per 1h
- Lavare in PBS1X, porre in etanolo 96% per 1 minuto e asciugare il vetrino all'aria
- Porre sul vetrino la mix per la PCR (Buffer 10X, MgCl, dNTP, dNTP marcati, Taq polimerasi, primer, H₂O)
- Impostare sull'ibridizzatore il ciclo della PCR: 95°C x 5'; 59°C x 1' (variabile a secondo dei primer utilizzati); 72°C x 8'; 4°C x ∞
- Lavare il vetrino in PBS1X, porre in etanolo 96% per 1 minuto e asciugare il vetrino all'aria
- Colorare con 25 µl di DAPI (1,5µg/ml) e montare con il vetrino coprioggetto

3. Risultati e discussione

3.1 *HLXB9*: coinvolgimento nelle patologie leucemiche

Localizzazione intranucleare di *HLXB9* in cellule della linea GDM-1

La linea cellulare leucemica GDM-1 è stata utilizzata come modello per studiare cellule appartenenti alla linea ematopoietica mieloide in cui il gene *HLXB9* è espresso in modo ectopico con un potenziale ruolo nell'istaurarsi della patologia tumorale. Infatti, le cellule ematopoietiche di individui sani, provenienti da sangue periferico, non esprimono questo gene dopo gli stadi di sviluppo embrionale. Invece cellule leucemiche di pazienti con traslocazione (7;12) e cellule della linea leucemica GDM-1 possiedono una overespressione di *HLXB9*.

L'analisi delle bande G della linea GDM-1 ha rivelato un cariotipo molto riarrangiato: 48XX, der(2)t(2;11)(q36;q13), t(6;7)(q23;q36), +8, del(12)(p11.2-p12.2), +13, del(16)(q23).

Fra le varie mutazioni cromosomiche che la GDM-1 presenta, vi è una traslocazione fra il cromosoma 6 e il cromosoma 7 che è stata presa in esame per verificare se l'overespressione di *HLXB9* di questa linea cellulare fosse collegata allo spostamento di questo gene, a causa del riarrangiamento cromosomico, in un compartimento nucleare diverso rispetto a quello dei linfociti maturi di un individuo normale.

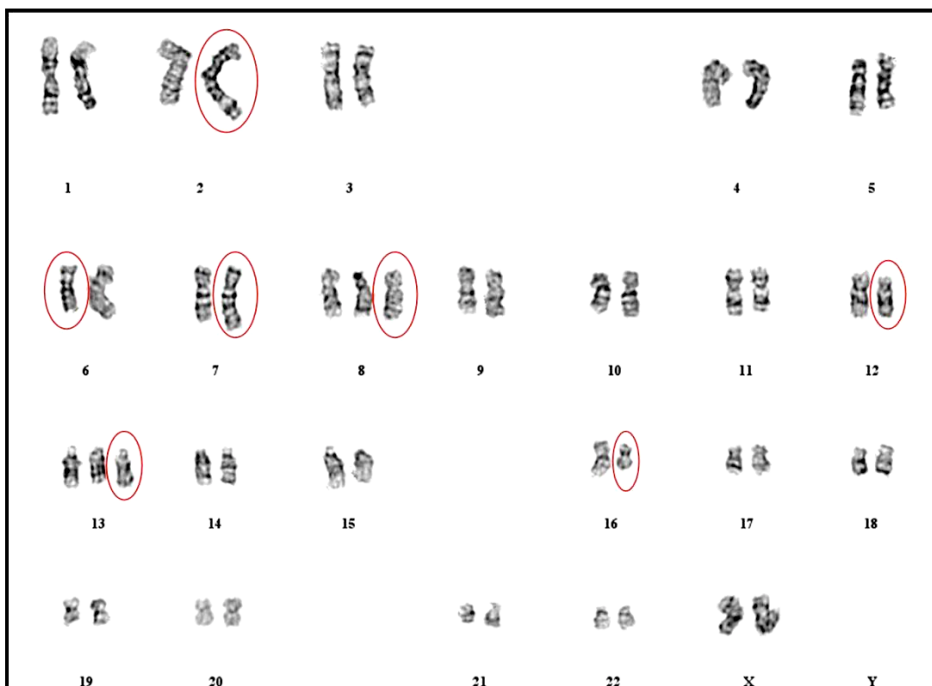


Fig. 17: Cariotipo in bande G ottenuto dalla linea cellulare GDM-1 processata con ipotonica KCl 0,075M e fissativo di Carnoy. In rosso sono evidenziati i riarrangiamenti cromosomici principali.

La letteratura mostra i breakpoint della traslocazione 6;7 vicini alla regione del gene *HLXB9*, nella banda 7q36, apparentemente fuori dalla regione codificante e nella banda 6q23 a monte di *MYB*, un gene attivato in leucemia. Mentre la funzione di *MYB* è stata intensamente studiata nelle cellule ematopoietiche dove influenza vari processi cellulari come la proliferazione e il differenziamento, la funzione di *HLXB9* e le conseguenze di un'espressione ectopica nelle cellule ematopoietiche sono ancora da chiarire. In figura 18 sono mostrate le regioni cromosomiche interessate dalla traslocazione (6;7) secondo i dati noti in letteratura.

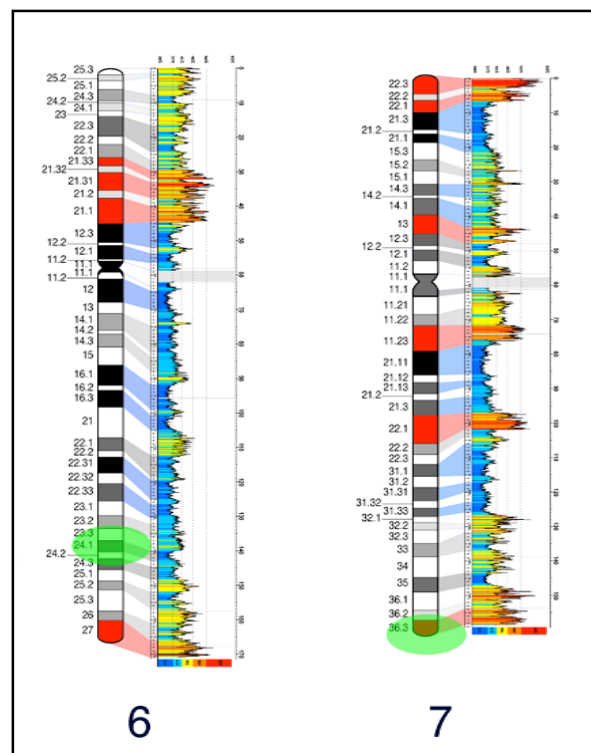


Fig. 18: In verde le regioni cromosomiche coinvolte nella traslocazione 6;7 della GDM-1; le bande interessate sono la 6q23 e la 7q36.

Inizialmente è stato necessario verificare i breakpoint di questa traslocazione per capire se il locus del gene *HLXB9* era coinvolto o meno nel riarrangiamento. Questo è stato fatto mediante esperimenti di ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) con l'utilizzo di una sonda PAC puntiforme, RCPI-5-1121A15, che contiene l'intero gene *HLXB9*, ibridata singolarmente e in combinazione con il painting del cromosoma 7.

Le ibridazioni del PAC RPCI-5-1121A15 effettuate sulla linea cellulare GDM-1 hanno mostrato che la sonda non modifica la sua posizione sui cromosomi, rimanendo sia sul cromosoma 7 wild-type che sul derivativo sulla banda 7q36.3. Si nota come sul cromosoma 7 derivativo la sonda non sia telomerica, come avviene sul cromosoma 7 wild-type, poiché è seguita dal frammento del cromosoma 6 traslocato (Fig. 19).

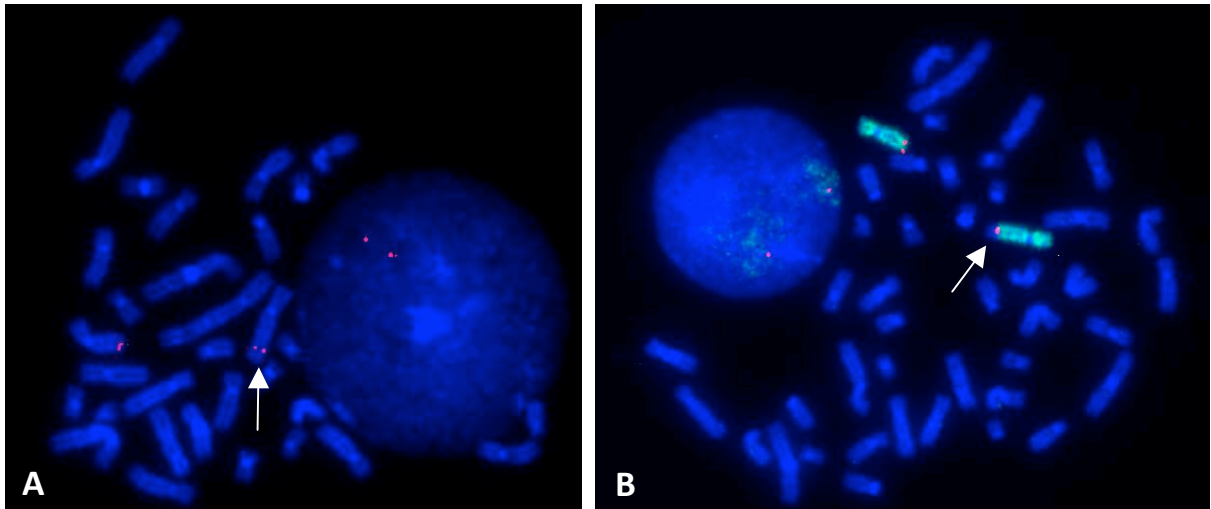


Fig. 19: Ibridazione *in situ* sulla linea cellulare GDM-1. A) Nucleo e metafase ibridate con sonda RPCI-5-1121A15, contenente il gene *HLXB9*, marcata con biotina e rilevata con avidina Texas Red (segnale rosso). B) Nucleo e metafase ibridate con sonda RPCI-5-1121A15 (segnale rosso) e painting del cromosoma 7 (segnale verde). Le frecce bianche indicano il cromosoma 7 derivativo coinvolto nella traslocazione.

Anche se il gene *HLXB9* non è contenuto nel frammento cromosomico che trasloca sul cromosoma 6 l'overespressione di *HLXB9*, evidenziata in questa linea da precedenti ricerche e confermata mediante esperimenti di Real time PCR e RT-PCR *in situ* (Fig. 20), potrebbe essere dovuta comunque al cromosoma 7 derivativo. Il gene infatti, subendo questo riarrangiamento, si troverà vicino regioni cromosomiche del cromosoma 6 che sono composizionalmente diverse dalle regioni wild-type e ciò potrebbe influenzare la sua posizione a livello nucleare e quindi i suoi livelli di espressione.

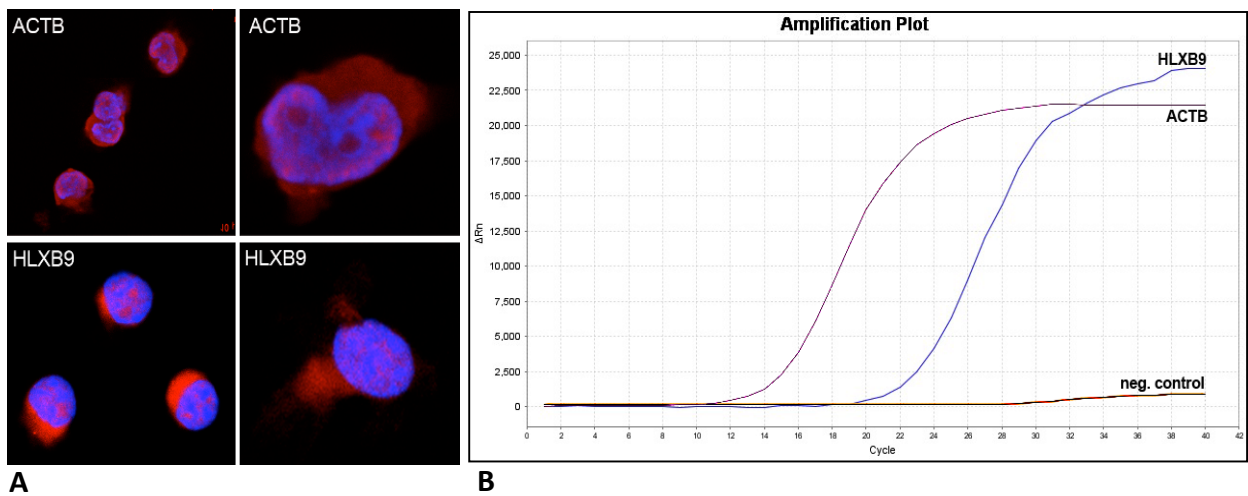


Fig. 20: A) RT PCR *in situ* su cellule della linea GDM-1 effettuata con primers per un gene housekeeping, *ACTB*, e per il gene target, *HLXB9* (segnale rosso). B) Plot di amplificazione dell'espressione del gene *HLXB9* e del gene *ACTB* verificata con Real time PCR.

Per studiare se l'allele di *HLXB9* del cromosoma 7 derivativo della linea cellulare GDM-1 modifica la sua posizione a livello nucleare rispetto all'allele sul cromosoma 7 wild-type sono state usate due combinazioni di sonde che hanno permesso, mediante esperimenti di ibridazione fluorescente *in situ* di valutare la localizzazione nucleare dei due alleli di *HLXB9*, distinguendo i segnali del cromosoma 7 normale da quelli del derivativo. Il pool di sonde utilizzato è stato il seguente:

la coppia:

- ❖ RPCI-5-1121A15, che contiene l'intero gene *HLXB9*, localizzata a livello della banda 7q36.3;
- ❖ RP11-48H15, localizzata a livello della banda 7q36.3 distale alla sonda 1121A15;

e la coppia:

- ❖ RPCI-5-1121A15;
- ❖ RP11-474A9, localizzato a livello della banda q24.3 del cromosoma 6, distale alla regione 6q23 che contiene il breakpoint della traslocazione;

Le caratteristiche delle sonde utilizzate sono elencate in tabella 2.

Tabella 2: sonde BAC e PAC utilizzate negli esperimenti di Ibridazione fluorescente *in situ*

Sonda	Vettore	Banda	Start	End	Lunghezza
RPCI-5-1121A15	PAC	7q36.3	155.918.582	156.049.029	130.447 bp
RP11-48H15	BAC	7q36.3	156.498.296	156.570.344	72.048 bp
RP11-474A9	BAC	6q24.3	145.609.951	145.804.203	194.253 bp

Tutte le sonde scelte sono state inizialmente ibridate su un cariotipo normale 46XX proveniente da una coltura di linfociti ottenuti da sangue periferico. È stata verificata l'esatta localizzazione delle sonde, la qualità del segnale ed è stata effettuata la localizzazione intranucleare.

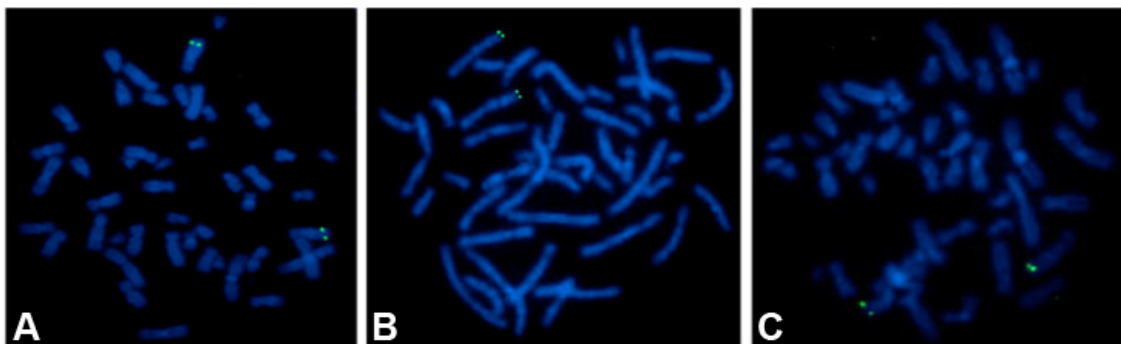


Fig. 21: Metafasi ottenute da linfociti trattati con ipotonica e fissativo di Carnoy. I preparati sono stati ibridati con le sonde specifiche marcate con biotina, rilevate poi con avidina-FITC (segnale verde) e successivamente colorati con DAPI (segnale blu). A) RPCI -5-1121A15; B) RP11-48H15; C) RP11-474A9

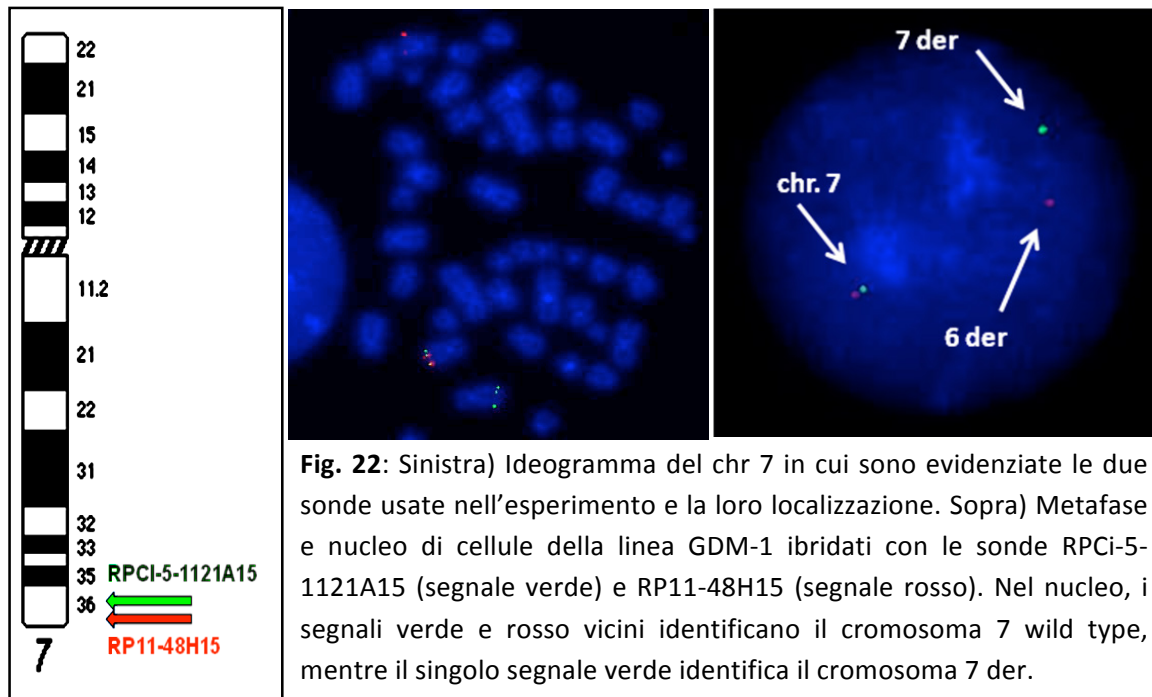
Le mediane ottenute dall'analisi dei segnali ibridati sui nuclei in interfase di linfociti, mostrate in tabella 3, sono state utilizzate negli esperimenti successivi come controlli normali da paragonare ai valori di mediana ottenuti sulle GDM-1.

Tabella 3: Localizzazione intranucleare delle sonde RPCI-5-1121A15, RP11-48H15 e RP11-474A9

Sonda	Valori di mediana
PAC RPCI-5-1121A15	>0,65; <0,745
RP11-48H15	0,669
RP11-474A9	0,754

I risultati della prima ibridazione *in situ* con le sonde RPCI-5-1121A15 e RP11-48H15 sulla linea GDM-1 mostrano chiaramente che il breakpoint della traslocazione è compreso tra le due sonde (in una regione di soli 450.000 nucleotidi circa). Il cromosoma 7 normale mantiene infatti il segnale verde e rosso, corrispondente rispettivamente alla sonda RPCI-5-1121A15 e alla sonda RP11-48H15, l'uno contiguo all'altro. Il cromosoma 7 portatore della traslocazione mantiene solo il segnale verde della sonda RPCI-1121A15, mentre la sonda RP11-48H15 trasloca sul cromosoma 6.

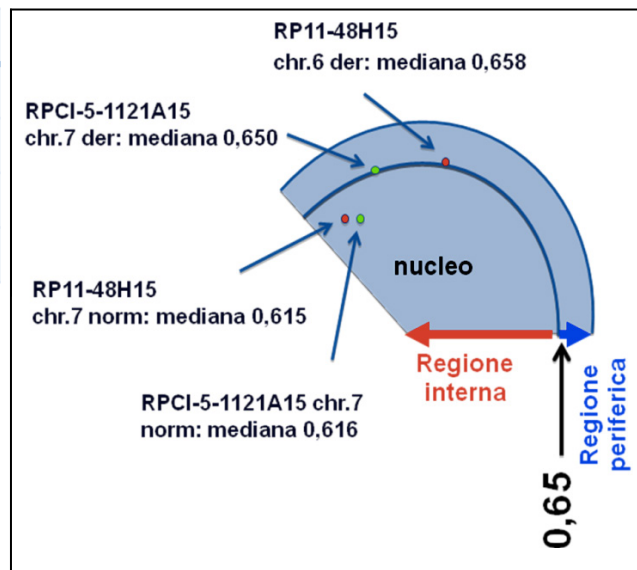
È possibile distinguere, anche sui nuclei, il cromosoma 7 wild-type, identificato dai segnali rosso e verde vicino, dal cromosoma 7 derivativo, identificato dal singolo segnale verde (Fig. 22).



Sono state collezionate, mediante microscopia a fluorescenza, le immagini di circa 300 nuclei ibridati con le sonde RPCI-5-1121A15 e RP11-48H15. La localizzazione intranucleare dei segnali dei nuclei raccolti ha mostrato i risultati illustrati in figura 23.

Allele	Sonda	Mediana
7 wild type	1121A15	0,616
7 wild type	48H15	0,615
7 derivativo	1121A15	0,650
6 derivativo	48H15	0,658

Fig. 23: Analisi bidimensionale dei segnali di ibridazione del gene *HLXB9*; i valori di mediana del chr 7 wild type indicano una localizzazione interna al nucleo mentre il chr 7der rimane in una regione alla periferia nucleare, come accade nei nuclei di linfociti normali.



Questi dati dimostrano come i loci identificati dalle sonde RPCI-5-1121A15 e RP11-48H15 rispettivamente sul cromosoma 7 derivativo e sul cromosoma 6 derivativo non modificano la loro localizzazione rispetto ai valori di mediana ottenuti sui controlli normali. Invece i valori di mediana delle stesse sonde sul cromosoma 7 wild-type si modificano, spostandosi da valori al di sopra dello 0,65 che indicano una localizzazione periferica a livello nucleare a valori al di sotto dello 0,65 che identificano loci più interni al nucleo e trascrizionalmente più espressi.

Successivamente l'esperimento di ibridazione è stato ripetuto con un'altra combinazione di sonde, la RPCI-5-1121A15 e la RP11-474A9, le cui caratteristiche sono state già indicate in tabella 2.

I risultati della seconda combinazione di sonde mostrano il cromosoma 7 derivativo, caratterizzato dal segnale verde e rosso corrispondente rispettivamente alla sonda RPCI-5-1121A15 (7q36.3) e alla sonda RP11-474A9 (6q24.3) l'uno contiguo all'altro a seguito della traslocazione del frammento del cromosoma 6 contenente la sonda RP11-474A9 con segnale rosso sul cromosoma 7 identificato dalla sonda RPCI-5-1121A15 di colore verde. I cromosomi 6 e 7 wild-type possiedono invece un unico segnale di ibridazione specifico in base alla localizzazione delle sonde usate (Fig. 24). I segnali osservabili sulle metafasi sono

paragonabili a quelli osservati sui nuclei che sono stati fotografati attraverso microscopia a fluorescenza e analizzati mediante software specifico.

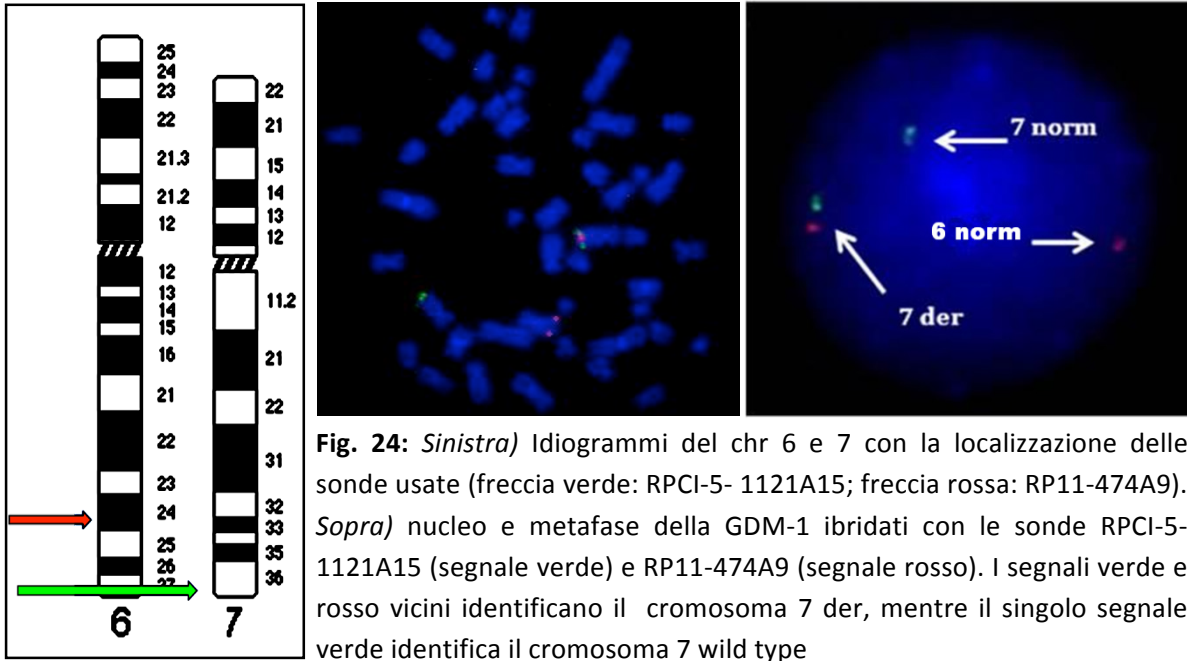
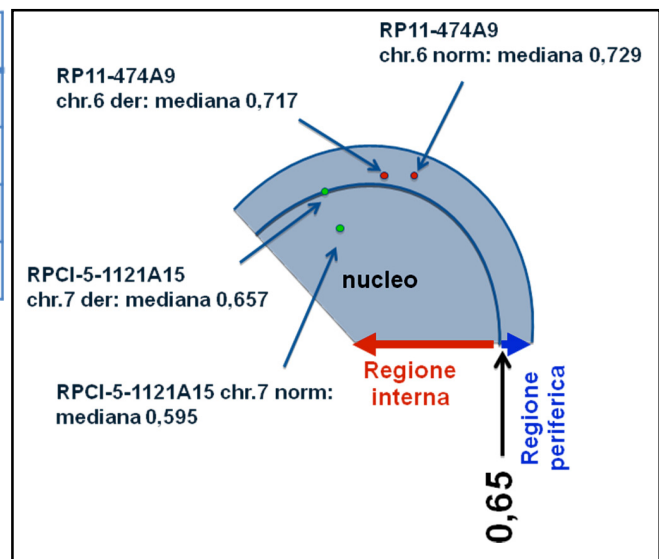


Fig. 24: Sinistra) Idiogrammi del chr 6 e 7 con la localizzazione delle sonde usate (freccia verde: RPCI-5- 1121A15; freccia rossa: RP11-474A9). Sopra) nucleo e metafase della GDM-1 ibridati con le sonde RPCI-5-1121A15 (segnale verde) e RP11-474A9 (segnale rosso). I segnali verde e rosso vicini identificano il cromosoma 7 der, mentre il singolo segnale verde identifica il cromosoma 7 wild type

I risultati dell'analisi bidimensionale dei nuclei in interfase ha attribuito i valori di mediana indicati in figura 25, che confermano esattamente il dato ottenuto con la prima combinazione di sonde.

Allele	Sonda	Mediana
7 wild type	1121A15	0,595
7 derivativo	1121A15	0,657
6 derivativo	474A9	0,717
6 wild-type	474A9	0,729

Fig. 25: Localizzazione in 2D dei segnali di ibridazione; i valori di mediana del cromosoma 7 wild type indicano una localizzazione interna del gene *HLXB9* mentre il cromosoma 7 der rimane in una posizione periferica.



Quindi dai risultati di questi esperimenti di ibridazione *in situ* è stato messo in evidenza un dato inaspettato, cioè la localizzazione ectopica non del gene *HLXB9* coinvolto nella traslocazione, bensì dell'allele presente sul cromosoma wild type. L'allele wild type potrebbe essere, invece, trovandosi in una regione interna al nucleo e maggiormente trascritta, il responsabile dell'overespressione di *HLXB9*.

Per validare questa ipotesi è stata effettuata una procedura di RT-PCR *in situ* con specifici primers per *HLXB9* seguita da una dual color FISH con le sonde del cromosoma 7 già usate nei precedenti esperimenti, la RPCI-5-1121A15 e RP11-48H15. Risultati preliminari sembrano confermare che l'allele trascritto è quello presente nel cromosoma 7 normale (identificato dai segnali delle due sonde contigue), che inoltre si trova in una regione del nucleo con cromatina più despiralizzata, come si evince dal colore blu più scuro ottenuto dopo colorazione con DAPI (Fig. 26).

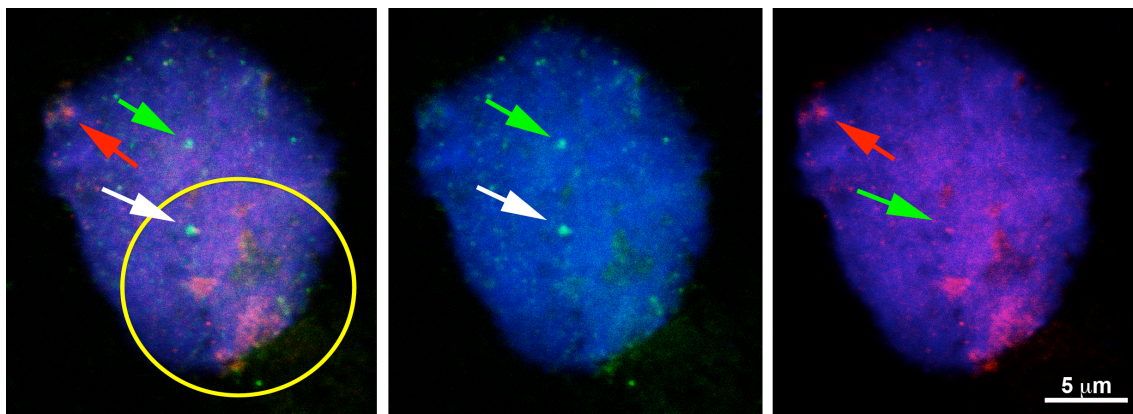


Fig. 26: RT-PCR *in situ* per il trascritto del gene *HLXB9* (segnali rossi: rodamina) associata con la FISH effettuata con le sonde RPCI-5-1121A15 (segnali verdi: fluoresceina) e RP11-48H15 (segnali rossi: texas red). Le frecce bianche indicano il segnale verde contiguo con quello rosso indicativo della presenza dell'allele di *HLXB9* localizzato sul cromosoma 7 normale. La freccia verde indica la posizione della sonda RPCI-5-1121A15 sul cromosoma 7der mentre la freccia rossa indica la posizione della sonda RP11-48H15 sul cromosoma 6 der. Il cerchio giallo indica la posizione dei trascritti di *HLXB9* in posizione adiacente al locus di *HLXB9* sul cromosoma 7 normale.

Il fatto che la traslocazione non determini una rilocalizzazione nucleare del cromosoma 7 derivativo può essere spiegato osservando che a seguito della traslocazione 6;7 il gene *HLXB9* sul cromosoma 7 derivativo si troverà vicino delle regioni L1+ del cromosoma 6, che notoriamente sono regioni povere in geni e localizzate alla periferia nucleare. È comprensibile quindi come esse non influenzino in alcun modo la localizzazione di *HLXB9* sul cromosoma 7 derivativo (Fig. 27).

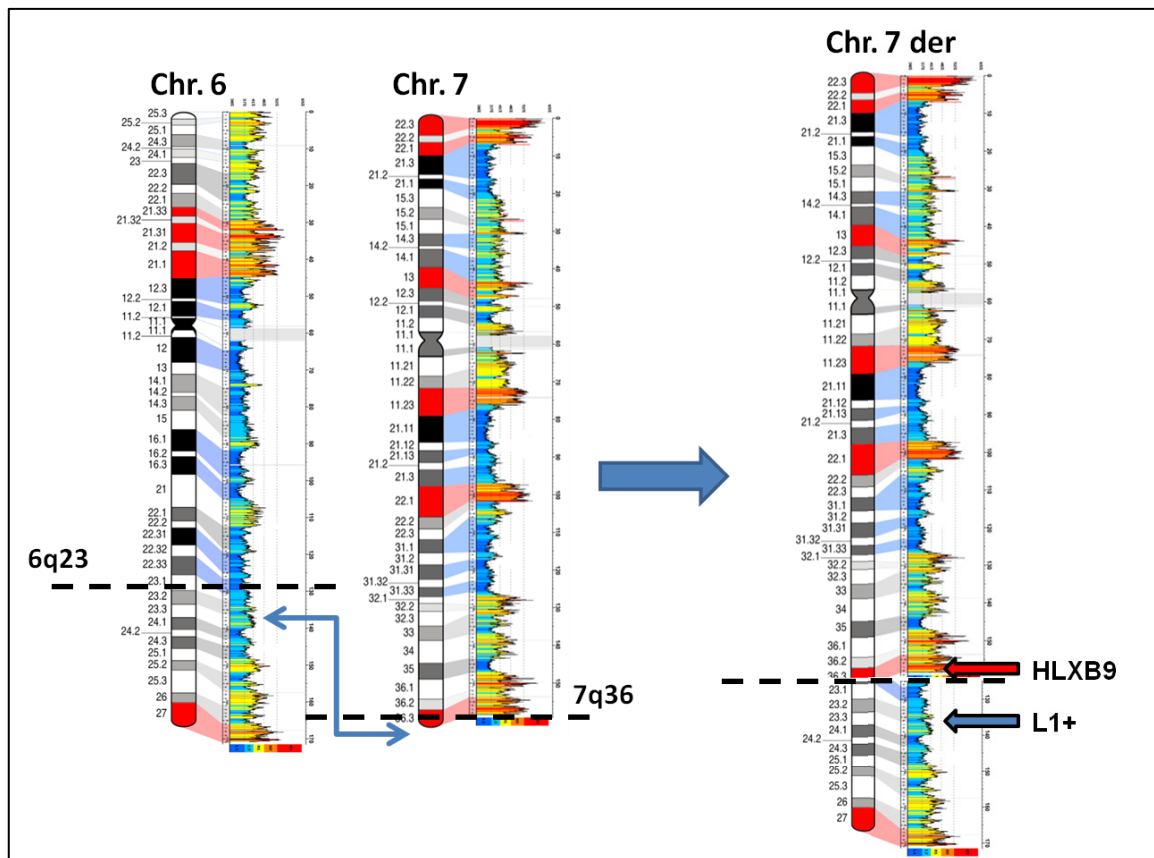


Fig. 27: A sinistra sono mostrati gli idiogrammi del cromosoma 6 e 7 in cui sono evidenziati mediante linea nera tratteggiata i siti di breakpoint della traslocazione 6;7. A destra l'idiogramma del cromosoma 7 der in cui si può notare la presenza di bande L1+ contigue al gene *HLXB9*.

Come già detto, è noto che il gene *HLXB9* non è espresso nei linfociti dopo lo sviluppo embrionale e che la GDM-1 possiede un'attivazione ectopica dello stesso a cui è attribuita un possibile coinvolgimento patologico. Esperimenti effettuati su linfociti posti in coltura per tre giorni con fitoemagglutina hanno dimostrato una riattivazione dell'espressione

del gene *HLXB9*. In figura 28 è mostrato un gel elettroforetico in cui sono stati caricati gli amplificati di un esperimento di Real Time PCR dove veniva valutato, insieme ad alcuni controlli, il gene *HLXB9*, utilizzando due diversi primers che amplificano regioni del gene differenti rispettivamente di 205 bp (primers a) e 137 bp (primers b), su linfociti appena prelevati, su linfociti posti in coltura con la fitoemagglutina e sulla linea cellulare GDM-1. Il risultato dimostra come solo nei linfociti appena prelevati il gene *HLXB9* è assente, subendo invece una riattivazione nei linfociti posti in coltura con la fitoemagglutina.

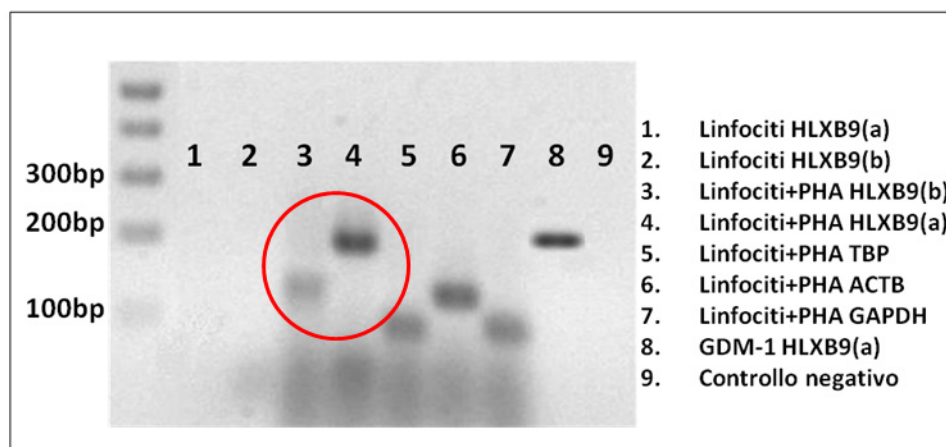


Fig. 28: Gel elettroforetico in cui è mostrata la riattivazione del gene *HLXB9* nei linfociti posti in coltura con la fitoemagglutina per tre giorni (amplificati cerchiati in rosso).

Questo dato è stato approfondito mediante esperimenti di immunofluorescenza con anticorpo anti-HB9 nelle medesime cellule (Fig. 29). Come si può notare dalle immagini la presenza della proteina HB9, indicata dal segnale verde in figura, si riscontra nella linea cellulare GDM-1 e solo nei linfociti stimolati dalla fitoemagglutina. La localizzazione dell'anticorpo nelle cellule della linea GDM-1 è sia citoplasmatica che nucleare, data l'overespressione del gene e quindi l'abbondanza della proteina. Nei linfociti stimolati dalla fitoemagglutina la localizzazione del fattore di trascrizione HB9 è principalmente nucleare ed in corrispondenza di regioni con cromatina più aperta che sembrano corrispondere alle regioni nucleolari, come osservato nelle cellule della linea GDM-1.

In figura 29 sono messi in evidenza anche i grafici relativi agli esperimenti di Real time PCR condotti con i primers per il gene *HLXB9* e per il gene di controllo *ACTB* sulla linea cellulare GDM-1, su linfociti appena prelevati e linfociti posti in coltura per tre giorni con fitoemagglutina. Dai plot di amplificazione possiamo notare la presenza dell'RNA di *HLXB9* nella linea GDM-1 e in misura minore nei linfociti stimolati dalla fitoemagglutina.

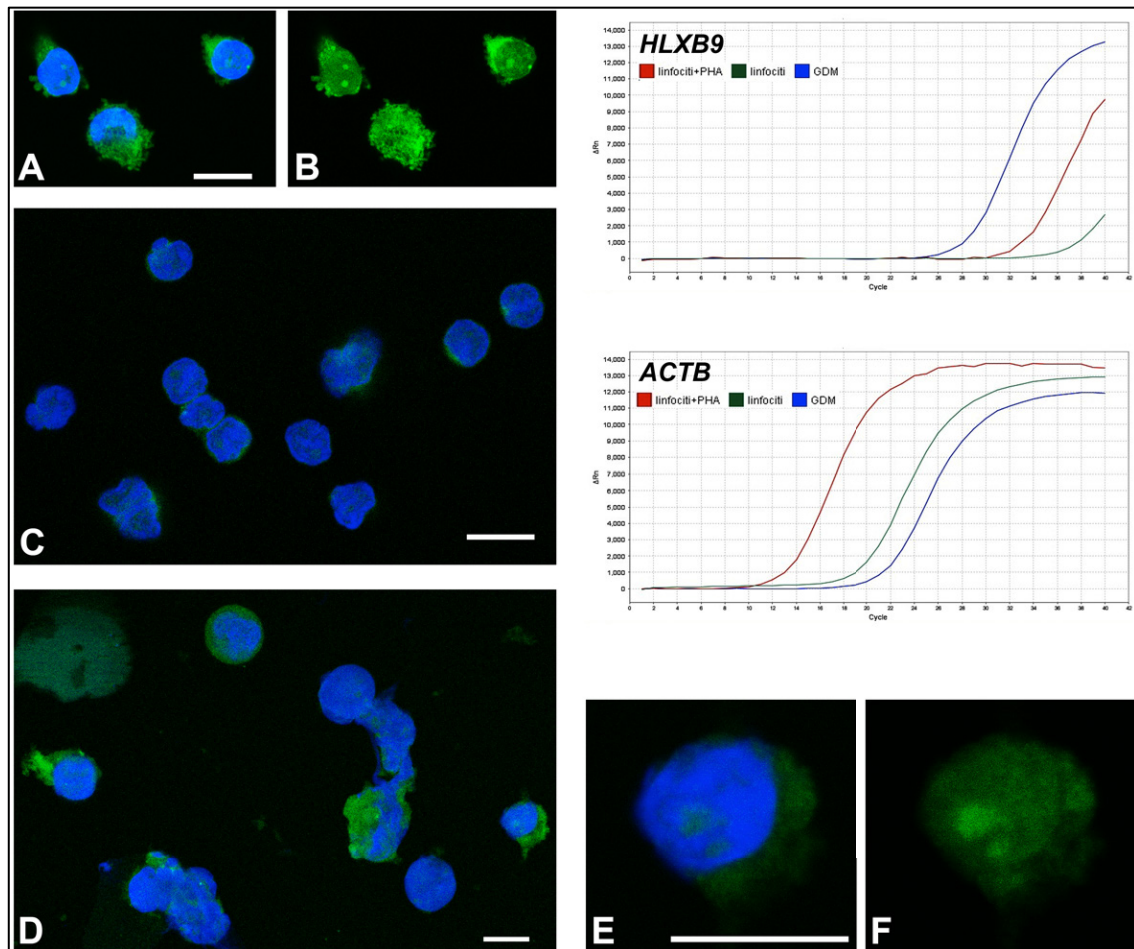


Fig. 29: Immunofluorescenza di HB9 in cellule GDM-1 (A, B), linfociti da sangue periferico (C), e linfociti da sangue periferico stimolati con PHA (D, E, F). Nuclei colorati con DAPI (Blu). Barra della scala: 10 μ m. In alto a destra: plot di amplificazione dell'esperimento di Real time PCR eseguito con i primer per *HLXB9* e per *ACTB* condotto sulla linea GDM-1, su linfociti stimolati con PHA e su linfociti appena prelevati. È possibile notare la presenza dell'amplificato di *ACTB* in tutti i campioni in studio al contrario dell'RNA di *HLXB9* evidenziato solo nella GDM-1 ed in misura inferiore nei linfociti stimolati.

Effettuando esperimenti di immunolocalizzazione su linfociti posti in coltura con fitoemagglutina con l'anticorpo per la proteina HB9 insieme ad un anticorpo con localizzazione nucleolare, come quello diretto contro la proteina Tau-1, si è potuto verificare che la localizzazione della proteina HB9 non è nucleolare come era sembrato in un primo momento. Infatti i segnali rilevati per le due proteine, Tau-1 in rosso e HB9 in verde, non coincidono: entrambi sono localizzati in regioni in cui la cromatina è molto despiralizzata, ma per HB9 non si tratta della regione del nucleolo (Fig. 30).

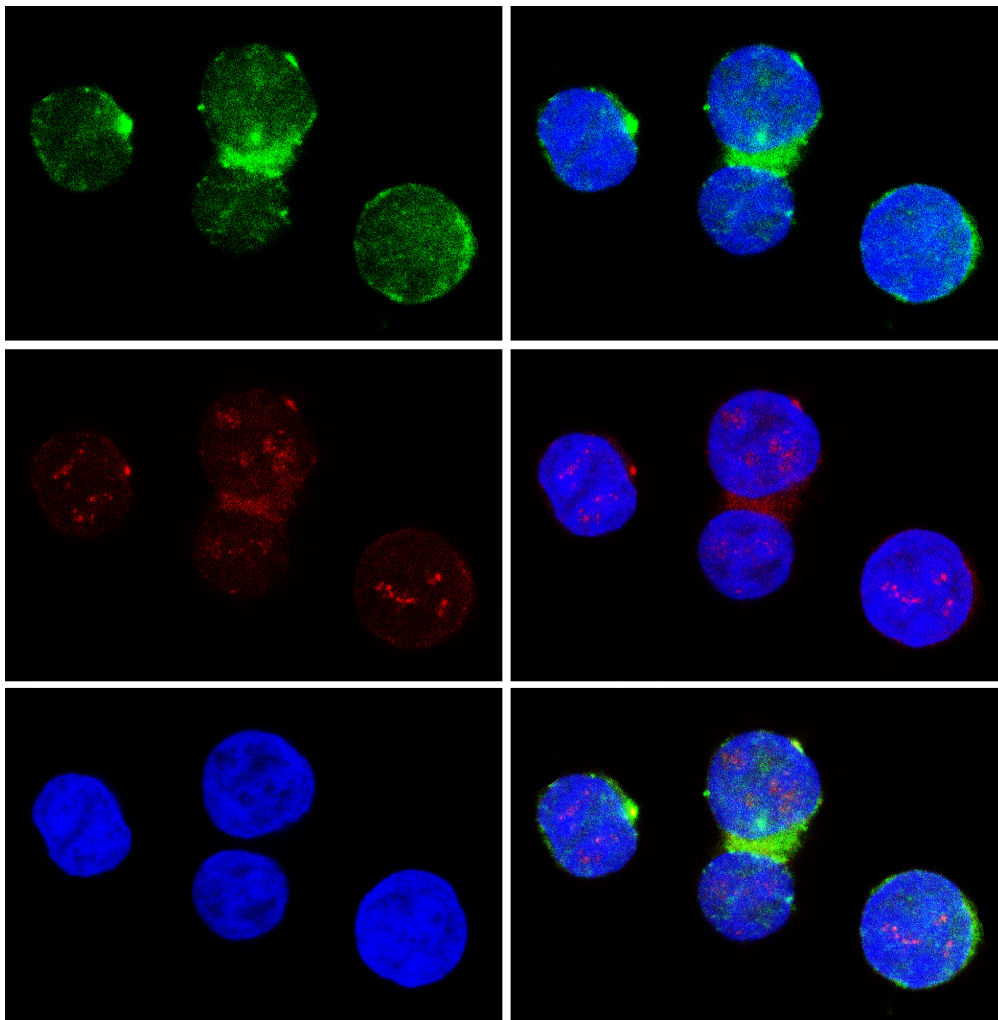


Fig. 30: Immunolocalizzazione, nei linfociti da sangue periferico umano dopo stimolazione con PHA, della proteina HB9 (segnali di colore verde) e di una proteina a localizzazione nucleolare (segnali di colore rosso). I nuclei sono colorati con DAPI (Blu). A sinistra sono mostrate le immagini ottenute con i singoli canali per il verde, il rosso e il blu.

L'ipotesi fatta sulla base di tutti i dati ottenuti negli esperimenti di Real time PCR e di immunofluorescenza propone che, nel caso specifico della linea GDM-1, poiché è stato verificato con più metodiche che l'overespressione di *HLXB9* non dipende dal riarrangiamento cromosomico, la presenza del gene e della rispettiva proteina potrebbe essere attribuibile ad un processo di riattivazione simile a quello che avviene nei blasti linfocitari delle colture di linfociti stimolati con fitoemagglutina.

Questa, infatti, riconducendo i linfociti maturi, già differenziati, ad uno stadio di blasti, che permette loro l'attiva replicazione, determina una riattivazione del gene *HLXB9* paragonabile a quella che avviene nella linea leucemica GDM-1.

Possibili geni target del fattore di trascrizione HB9 in cellule ematopoietiche

La proteina HB9, essendo un fattore di trascrizione, agirà da repressore o da attivatore di altri geni. Così sono stati presi in esame tre possibili bersagli del gene *HLXB9*: il recettore E2 per la prostaglandina (*PTGER2*), l'interleuchina 6 (*IL6*) e l'interleuchina 8 (*IL8*). Sono note le proprietà benefiche di immunomodulazione e differenziazione che la prostaglandina effettua sul sistema ematopoietico e recentemente è stato messo in luce il coinvolgimento delle interleuchine nei processi tumorali. L'espressione dei geni *PTGER2*, *IL6* e *IL8* è stata perciò valutata mediante esperimenti di real time PCR nella linea cellulare GDM-1, su l'RNA di linfociti appena prelevati e su linfociti posti in coltura sotto la stimolazione della fito-emagglutinina per tre giorni. I primers scelti e le loro caratteristiche sono indicati in tabella 4.

Tabella 4: Caratteristiche dei primer per i geni *PTGER2*, *IL6* e *IL8*

Gene	Forward	Reverse	Tm°	Amplificato
PTGER2	CTTGCCTTTCACGATTTTTG	AAAAACCTAAGAGCTTGGAG	60°	81 bp
IL6	GCAGAAAAAGGCAAAGAATC	CTACATTTGCCGAAGAGC	59°	179 bp
IL8	GTTTTTGAAGAGGGCTGAG	TTTGCTTGAAGTTTCACTGG	59°	89 bp

I risultati degli esperimenti di Real time PCR mostrano che il gene *PTGER2* è espresso nei linfociti appena prelevati e in quelli posti in coltura, mentre subisce una down-regolazione totale nella linea GDM-1 dove *HLXB9* è attivo. Dai dati presenti in figura 31 si evince che il gene *PTGER2* è espresso nei linfociti, usati come campione calibratore, nei linfociti posti in coltura con la fitoemoagglutinina senza la presenza di incrementi rilevanti, mentre è silente nella linea GDM-1.

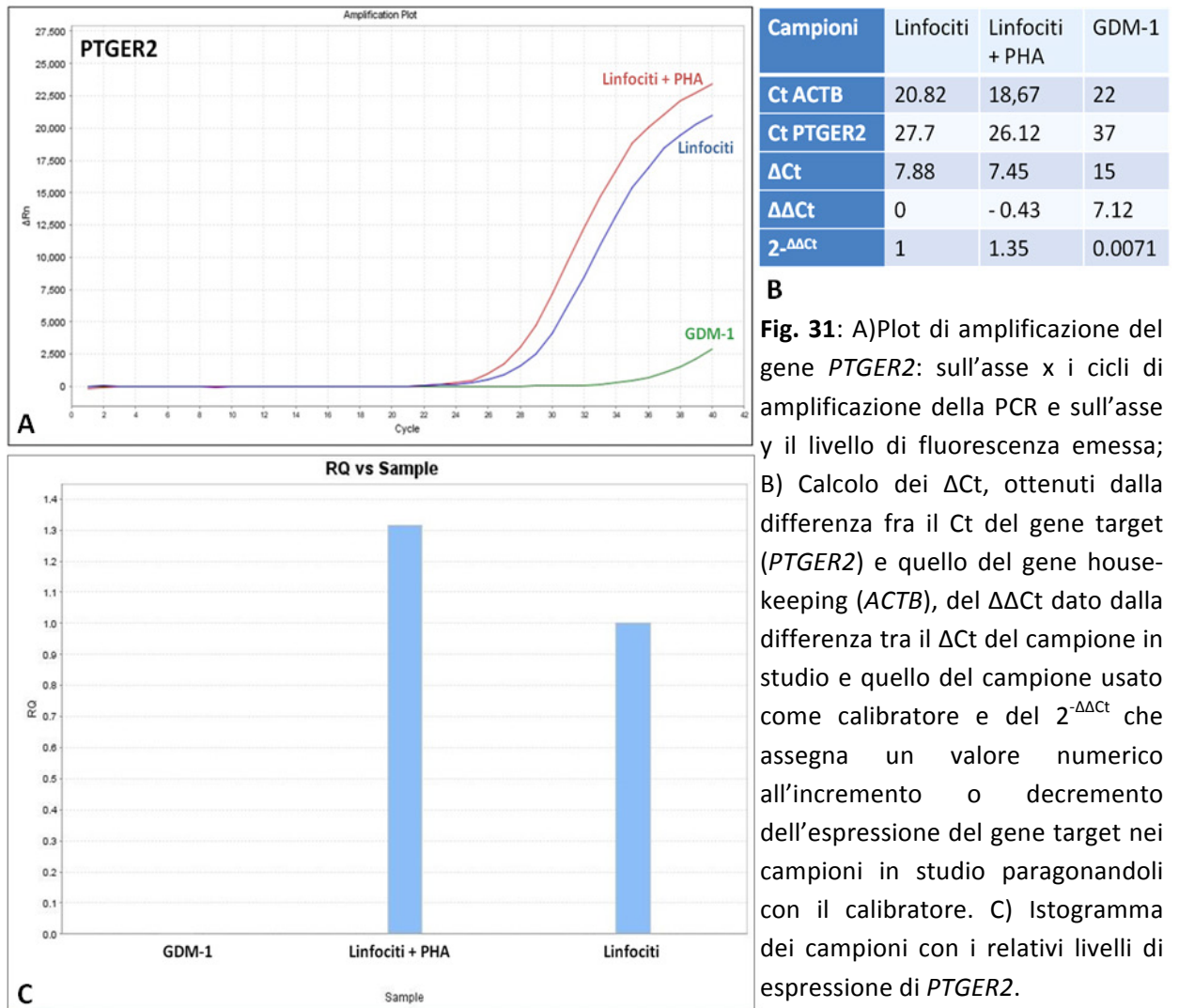
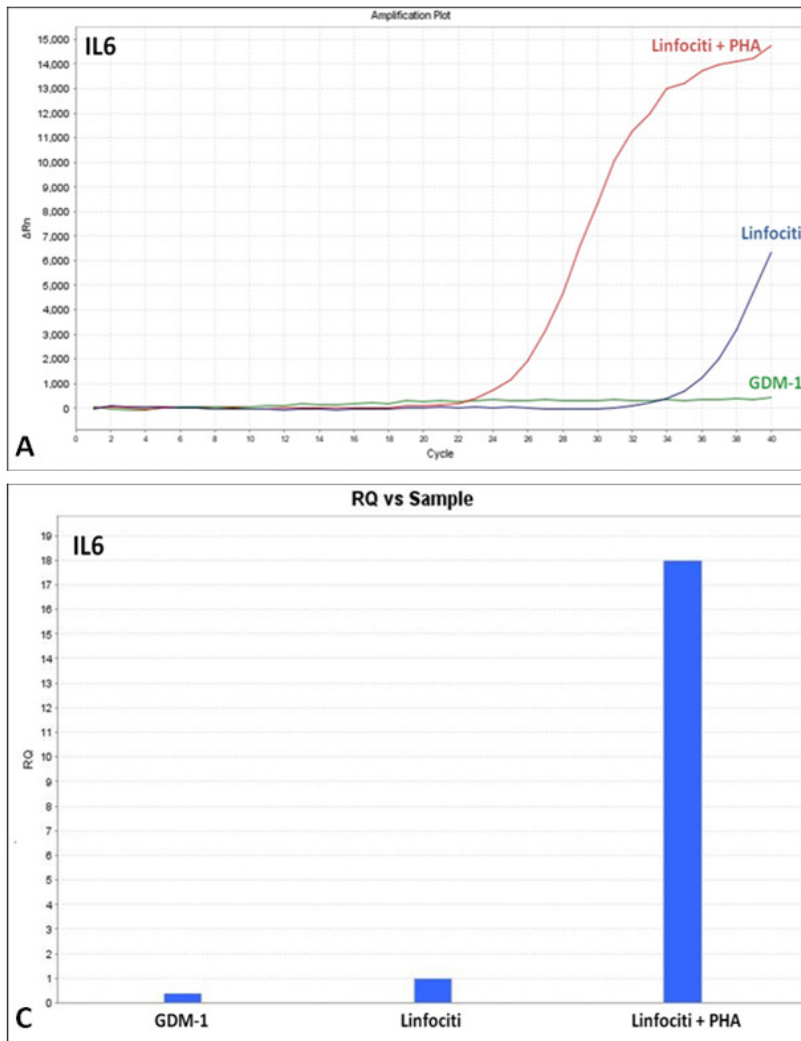


Fig. 31: A) Plot di amplificazione del gene *PTGER2*: sull'asse x i cicli di amplificazione della PCR e sull'asse y il livello di fluorescenza emessa; B) Calcolo dei ΔCt , ottenuti dalla differenza fra il Ct del gene target (*PTGER2*) e quello del gene house-keeping (*ACTB*), del $\Delta\Delta Ct$ dato dalla differenza tra il ΔCt del campione in studio e quello del campione usato come calibratore e del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ che assegna un valore numerico all'incremento o decremento dell'espressione del gene target nei campioni in studio paragonandoli con il calibratore. C) Istogramma dei campioni con i relativi livelli di espressione di *PTGER2*.

Il gene *IL6* ha mostrato alti livelli di espressione nei linfociti resi replicativi con la fitoemagglutinina rispetto ai livelli molto bassi presenti nell'RNA estratto da linfociti differenziati e appena prelevati. Questo può essere spiegato dato che l'Interleuchina 6 è descritta in letteratura, insieme all' Interleuchina 2, come agente induttore della proliferazione dei linfociti T, che sono proprio quelli stimolati *in vitro* dalla fitoemagglutinina. Il gene per l'Interleuchina 6 risulta invece non trascritto nella linea GDM-1 (Fig. 32).



Campioni	Linfociti	Linfociti + PHA	GDM-1
Ct ACTB	20,83	15,50	22,96
Ct IL6	33,94	24,44	38,90
ΔCt	13,11	8,94	15,94
$\Delta\Delta Ct$	0	- 4,16	2,83
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1	17,88	0,574

Fig. 32: A) Plot di amplificazione del gene *IL6*: sull'asse x i cicli di amplificazione della PCR e sull'asse y il livello di fluorescenza emessa; B) Calcolo dei ΔCt , ottenuti dalla differenza fra il Ct del gene target (*IL6*) e quello del gene house-keeping (*ACTB*), del $\Delta\Delta Ct$ dato dalla differenza tra il ΔCt del campione in studio e quello del campione usato come calibratore e del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Come si può osservare i linfociti stimolati dalla PHA hanno un livello di espressione dell'*IL6* diciassette volte superiore ai linfociti non stimolati usati come campione calibratore; C) Istogramma dei campioni con i relativi livelli di espressione dell'*IL6*.

La down-regolazione del gene *PTGER2* e dell'*IL6* nella linea GDM-1 potrebbe essere una causa dell'azione del gene *HLXB9*, soprattutto per il gene *PTGER2* già indicato in letteratura fra i possibili target di *HLXB9*. Ulteriori indagini potranno essere effettuate mediante metodiche che permettono di silenziare *HLXB9* nella linea cellulare GDM-1. Così facendo, una riattivazione del gene *PTGER2* o del gene *IL6* sarebbe la prova del legame fra il fattore di trascrizione *HB9* e i geni in studio.

Per quanto riguarda l'Interleuchina 8 (*IL8*), non si hanno cambiamenti drastici nella linea GDM-1. Il gene è espresso nei linfociti, è up-regolato nei linfociti stimolati dalla fitoemagglutina (3,39 volte in più rispetto ai linfociti usati come campione calibratore) ed è espresso, anche se in misura minore, nelle GDM-1 (Fig. 33). La up-regolazione dell'*IL8* a seguito di stimolazione con PHA è stata già evidenziata in

letteratura e motivata dal fatto che i monociti, che sono messi in coltura insieme ai linfociti dopo separazione con soluzione di Ficoll, sono i principali produttori di IL8 che recluta successivamente altri mediatori dell'infiammazione. Inoltre anche il siero, che viene aggiunto al terreno di coltura in cui sono posti linfociti e monociti prelevati e separati dal resto delle cellule nucleate del sangue, è considerato un cofattore nella produzione di IL8.

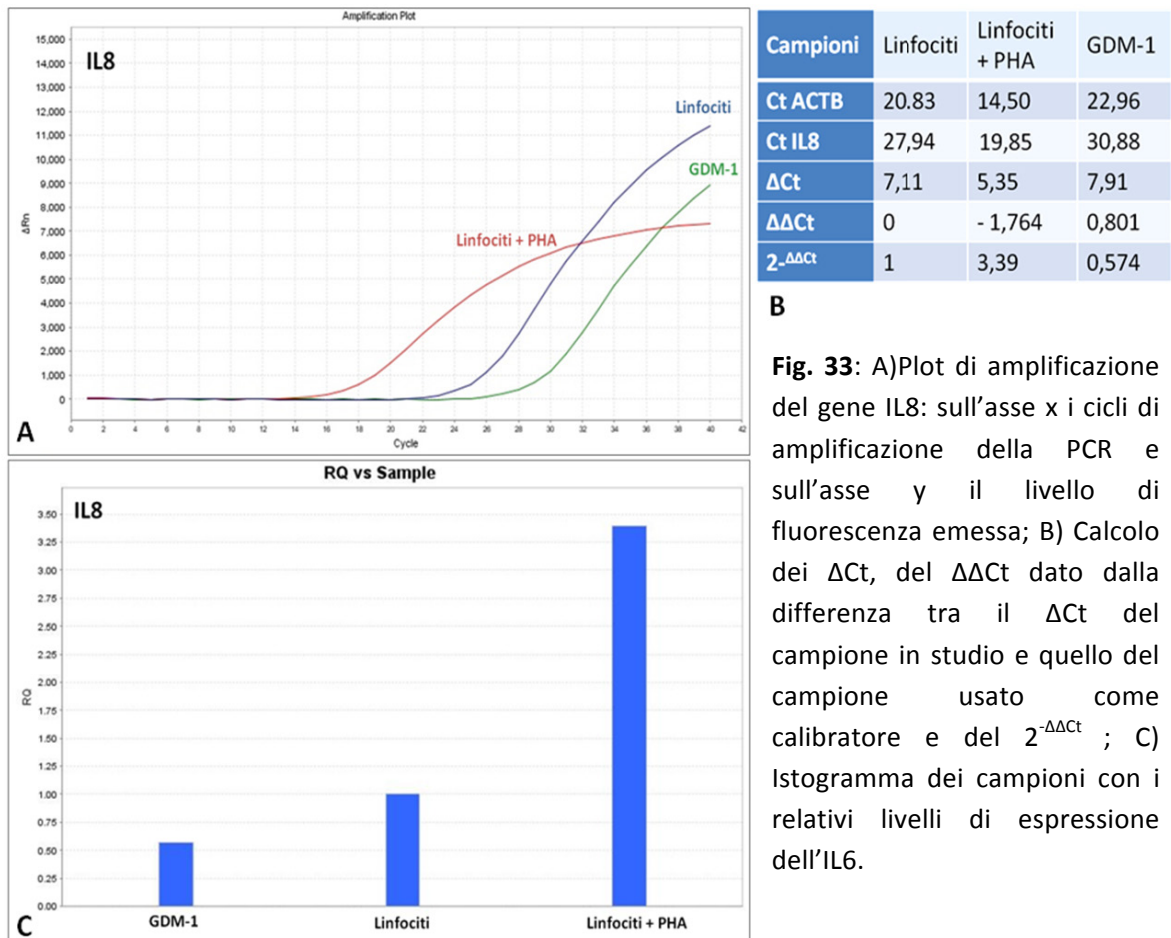


Fig. 33: A) Plot di amplificazione del gene IL8: sull'asse x i cicli di amplificazione della PCR e sull'asse y il livello di fluorescenza emessa; B) Calcolo dei ΔCt , del $\Delta\Delta Ct$ dato dalla differenza tra il ΔCt del campione in studio e quello del campione usato come calibratore e del $2^{-\Delta\Delta Ct}$; C) Istogramma dei campioni con i relativi livelli di espressione dell'IL6.

In figura 34 sono mostrate le bande elettroforetiche dei geni target studiati nei rispettivi campioni. Le altezze delle bande rispecchiano la grandezza degli amplificati (indicati precedentemente in tabella 4), e gli amplificati ottenuti e le loro quantità sono perfettamente in accordo con i dati ottenuti negli esperimenti di Real time PCR.

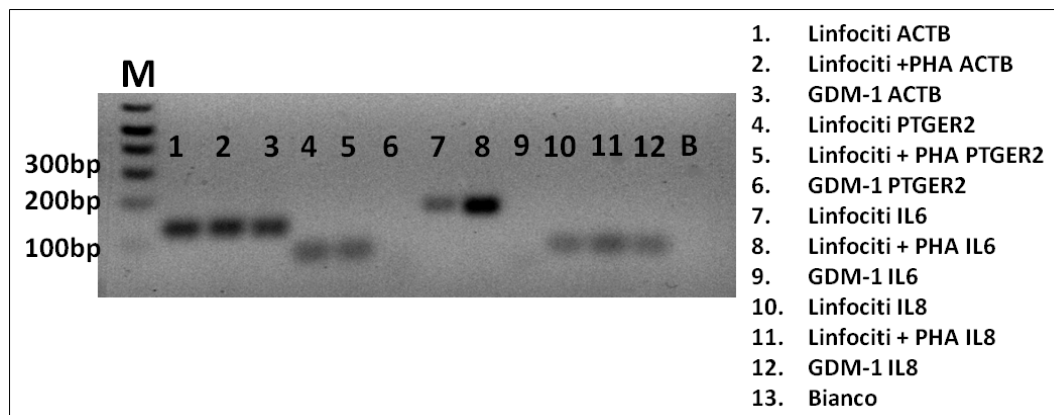


Fig. 34: Elettroforesi su gel di agarosio al 2% degli amplificati ottenuti dagli esperimenti di Real time PCR. È possibile notare l'assenza di amplificato nella line 6 e nella 9, corrispondente alla mancanza di espressione del gene *PTGER2* e *IL6* nella linea GDM-1.

Localizzazione intranucleare del gene *HLXB9* in pazienti con disordini mieloidi

Nell'ambito dello studio del coinvolgimento patologico del gene *HLXB9*, sono stati presi in esame una serie di pazienti con disordini mieloidi (dalla dott.ssa Tosi - Brunel University, London, UK) caratterizzati da delezioni di una regione del braccio lungo di uno dei due cromosomi 7. I pazienti mostrano delezioni con breakpoint differenti, ma tutti mantengono il gene *HLXB9* su entrambi i cromosomi 7. Il breakpoint prossimale è sempre nella banda 7q22 mentre quello distale in 7q36 o in 7q31.

I preparati cromosomici di questi pazienti sono stati ibridati con painting del cromosoma 7 (segnale verde) e con la sonda RPCI-5-1121A15 biotinilata (segnale rosso) che identifica il gene *HLXB9* (Fig. 35). Questa parte degli esperimenti è stata effettuata durante il periodo di attività svolta all'estero presso la Brunel University di Londra, nel laboratorio della Dott.ssa Sabrina Tosi.

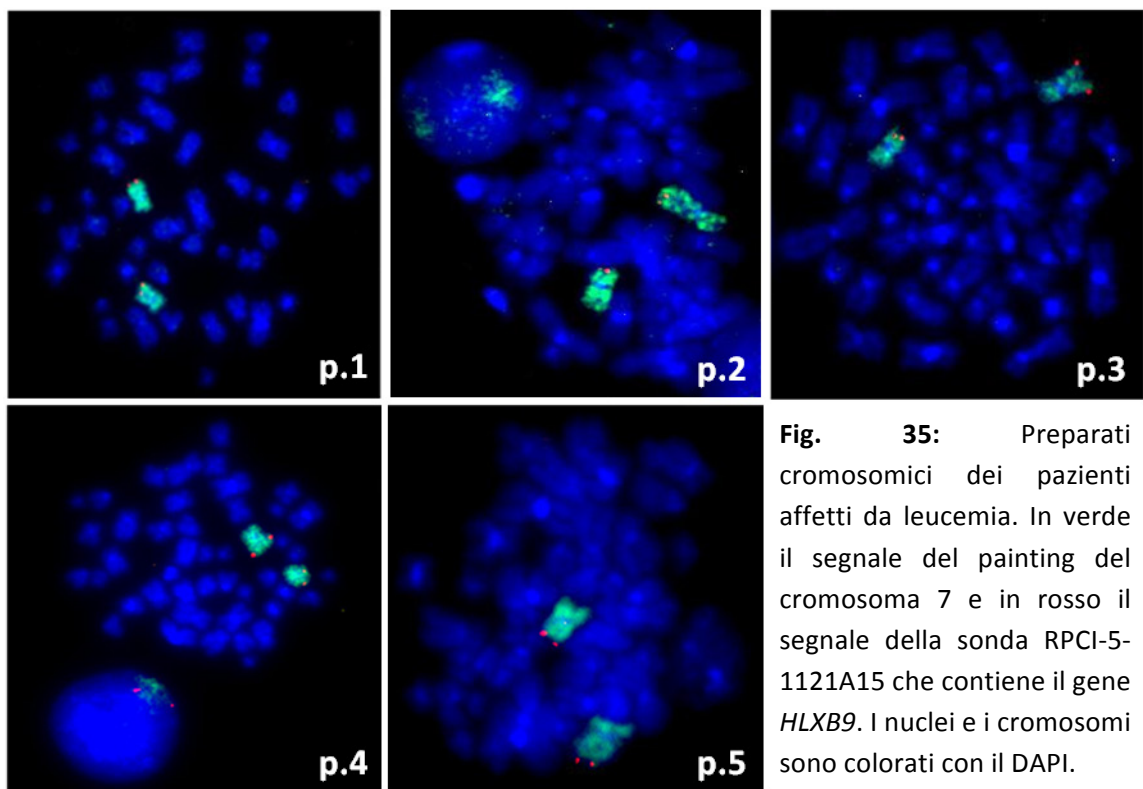


Fig. 35: Preparati cromosomici dei pazienti affetti da leucemia. In verde il segnale del painting del cromosoma 7 e in rosso il segnale della sonda RPCI-5-1121A15 che contiene il gene *HLXB9*. I nuclei e i cromosomi sono colorati con il DAPI.

Anche per questi pazienti è stata effettuata la localizzazione intranucleare del segnale di ibridazione del gene *HLXB9* su circa 300 nuclei per paziente. Le mediane ottenute con i dati di ciascun paziente sono indicate in figura 36.

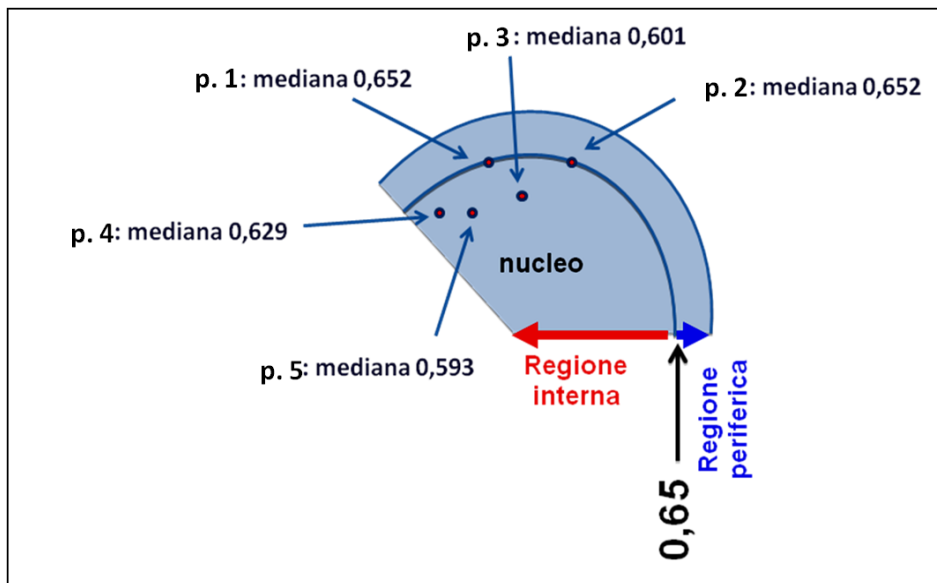


Fig. 36: Valori di mediana del PAC RPCI-5-1121A15 ottenuti dall'analisi di più di 300 nuclei in interfase dei pazienti studiati.

I valori di mediana indicano che i pazienti 3, 4 e 5 hanno subito un cambiamento nella localizzazione del gene *HLXB9* rispetto ai valori dei controlli normali per lo stesso gene, mentre i pazienti 1 e 2 mantengono una mediana intorno allo 0,65. La scarsa quantità di preparato cromosomico e l'impossibilità di procedere con esperimenti 3D avendo disponibilità del solo preparato in fissativo acido acetico e metanolo, non ha permesso però di approfondire questo dato. Si poteva infatti, trovando un'opportuna combinazione di sonde, come è stato fatto con la linea cellulare GDM-1, discriminare l'allele wild type dall'allele portatore della delezione. Si sarebbe così potuto ottenere un valore di mediana singolo per ciascun allele e capire quale di questi contribuisce al riposizionamento del gene *HLXB9* nei pazienti studiati.

Sebbene il gene *HLXB9* non sia coinvolto nelle delezioni che colpiscono i pazienti, il riposizionamento genico a livello nucleare potrebbe essere causato dalle regioni che a causa del riarrangiamento cromosomico si avvicinano al gene *HLXB9*. Prendendo come esempi il paziente p.2 e il paziente p.3, che possiedono dati citogenetici maggiormente definiti, possiamo ipotizzare cosa accade come conseguenza della delezione.

Nel paziente p.2 la banda 7q36.3 si troverà, a causa della delezione, vicina ad una regione L1+ povera in geni e in una regione nucleare con cromatina compatta; nel paziente p.3, invece, si troveranno contigue, a causa del riarrangiamento, due regioni

H3+ ad alto contenuto in GC e localizzate in una regione nucleare con cromatina più despiralizzata (Fig. 37). Questo potrebbe rappresentare una valida ipotesi alla rilocalizzazione nucleare del gene *HLXB9* che si presenta nel paziente p.3 e non nel paziente p.2.

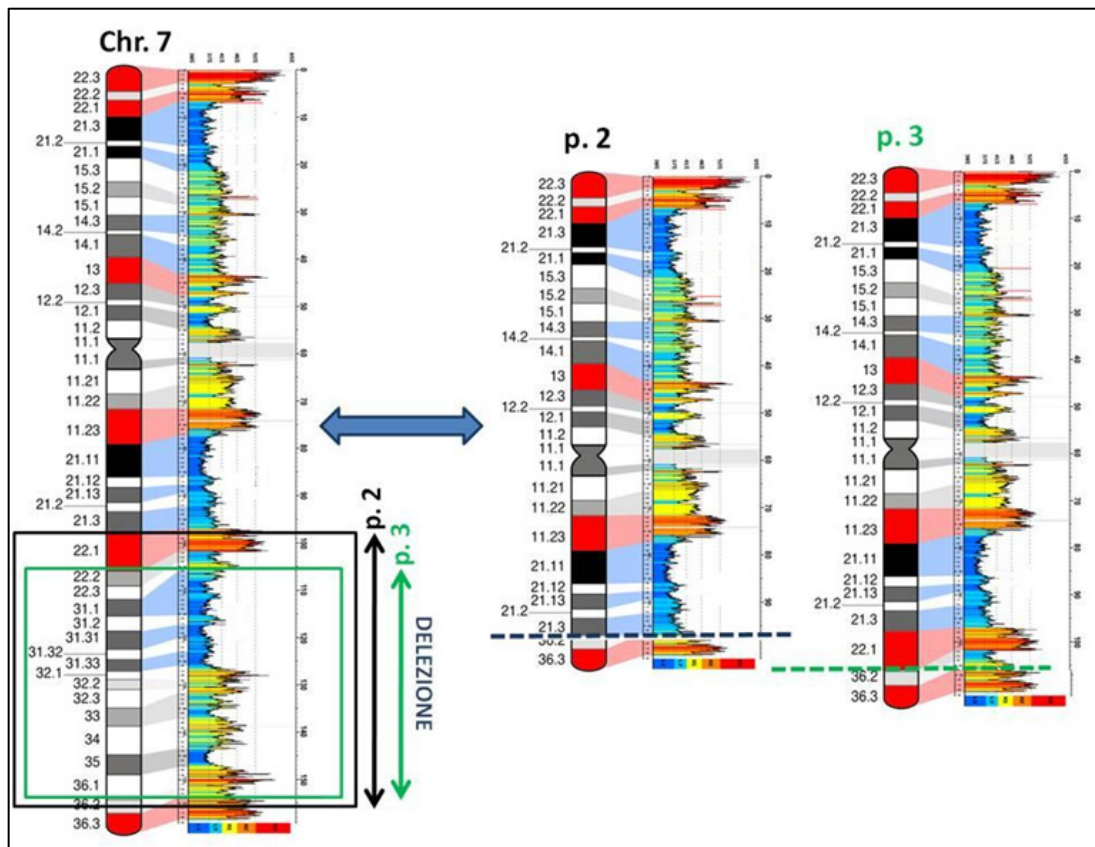


Fig. 37: A sinistra è rappresentato l'idiogramma del cromosoma 7 con l'indicazione delle regioni delete, in verde quella per il paziente p.3 e in nero la delezione che caratterizza il paziente p.2. A destra è rappresentato quello che accade al cromosoma 7 del paziente p.2 e p.3 a seguito del riarrangiamento cromosomico. Il paziente p.2 si troverà con la regione 7q21.3 contigua alla regione q36; il paziente p.3 avrà invece la regione q22.1 fiancheggiante la q36.

3.2 Espressione del gene *HLXB9* in cellule nervose

Localizzazione intranucleare e analisi di espressione durante il differenziamento neuronale

Per valutare l'espressione del gene *HLXB9* in cellule paragonabili a quelle in cui esso è fisiologicamente espresso essendo implicato nel differenziamento e nello sviluppo dei motoneuroni, è stata usata una linea cellulare di neuroblastoma umano, la SK-N-BE. Tali cellule, quando sono indotte con acido retinoico, differenziano in cellule di tipo nervoso. Attraverso l'utilizzo di questa linea cellulare è stato creato un modello di sviluppo neuronale, dalla proliferazione embrionale, allo stadio di neurone adulto ed infine alla morte cellulare per apoptosi.

Il differenziamento è stato effettuato con l'aggiunta al terreno di crescita, al giorno 0, 3, 6 e 9, di acido retinoico alla concentrazione di 10 μ M. Le cellule in differenziamento sono tenute al buio per evitare la disattivazione del retinoide e durante tutto il periodo di differenziamento sono visibili dei grossi cambiamenti morfologici, fra cui l'arresto della replicazione, la crescita del corpo cellulare e la formazione di lunghi prolungamenti simil-dendritici. Nelle cellule differenziate il neurite appare fino a tre volte più lungo del diametro del corrispondente corpo cellulare paragonato con quello delle cellule non differenziate in cui esso è più corto. Inoltre le cellule non differenziate sono più rotondeggianti e hanno pochi neuriti o sinapsi apparenti.

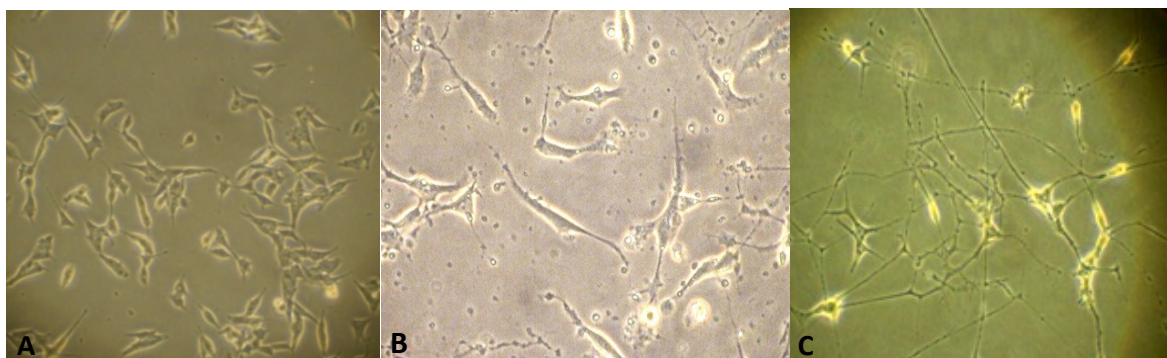


Fig. 38: Cellule SK-N-BE in coltura. A) proliferative; B) 6° giorno di differenziamento; C) 12° giorno di differenziamento.

La formazione dei neuriti e quindi il loro aumento numerico, che si riscontra nelle cellule differenziate paragonate a quelle proliferative, è una espressione morfologica della plasticità neuronale e del differenziamento e coinvolge diversi processi biochimici diretti alla promozione dell'assemblaggio dei monomeri di tubulina e alla creazione dei polimeri citoscheletrici che supportano tale fenomeno.

L'avvenuto differenziamento è stato confermato attraverso la verifica dell'incremento di alcuni marcatori comunemente usati in letteratura come GAP-43 e la β -tubulina. Entrambi sono stati verificati mediante esperimenti di immunofluorescenza con anticorpi specifici diretti contro tali proteine (Fig. 39 e 40).

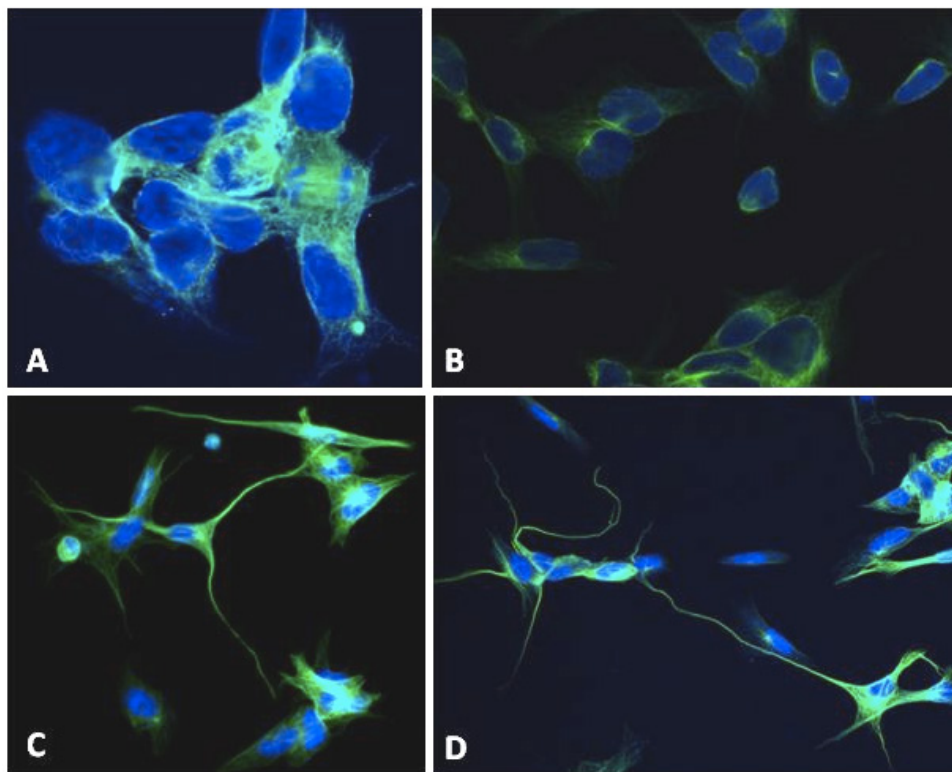


Fig. 39: Immunofluorescenza con anticorpo diretto contro la proteina β -tubulina (segnale verde): A-B) cellule SK-N-BE proliferative C-D) cellule SK-N-BE differenziate.

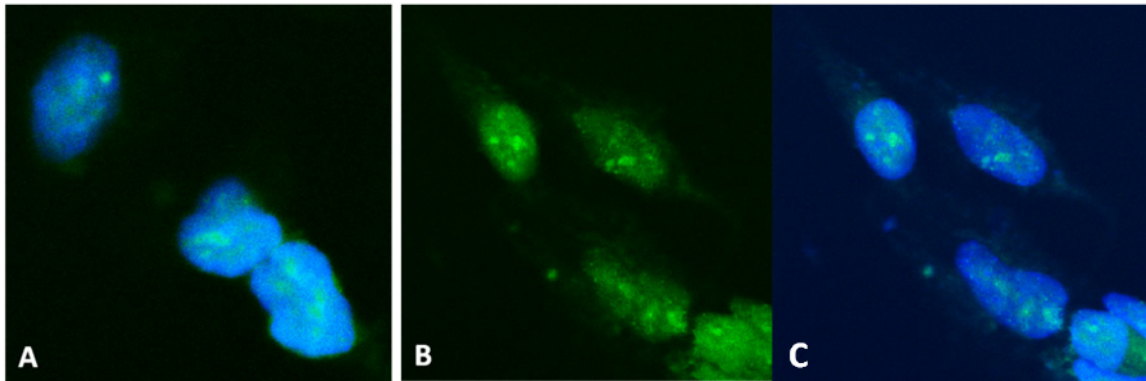


Fig. 40: Immunofluorescenza con anticorpo anti GAP-43 (segnale verde). A) cellule SK-N-BE proliferative; B) cellule SK-N-BE differenziate al 12° giorno (Fluoresceina); C) cellule SK-N-BE differenziate al 12° giorno (Fluoresceina + DAPI).

Inizialmente, mediante esperimenti di ibridazione *in situ* con la sonda PAC RPCI-5-1121A15, che contiene l'intero gene *HLXB9*, seguiti dall'analisi dei segnali puntiformi ottenuti, è stata valutata la localizzazione del gene all'interno dei nuclei in interfase nelle tre fasi principali del modello di differenziamento neuronale indotto dall'acido retinoico, cellule proliferative e cellule al sesto e al dodicesimo giorno di differenziamento. I risultati indicano che *HLXB9* è localizzato in una posizione più periferica nei nuclei delle SK-N-BE proliferative con valori di mediana di 0,73 ed ha invece una localizzazione più interna nelle SK-N-BE al 6° giorno di differenziamento, con valori di mediana di 0,62, e nelle SK-N-BE al 12° giorno di differenziamento con valori di mediana di 0,60.

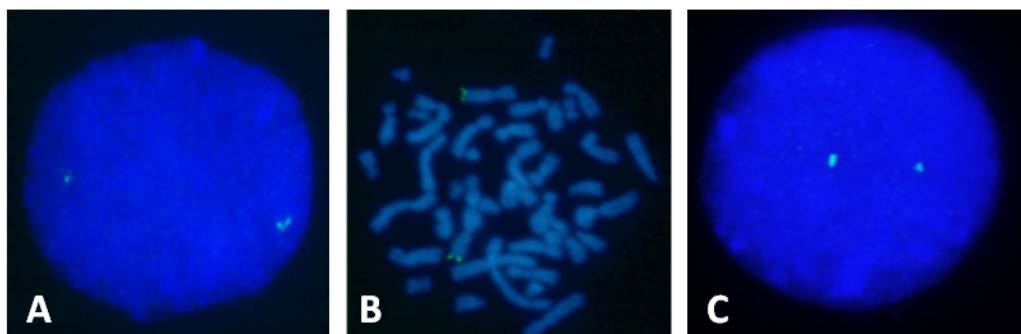


Fig. 41: Ibridazione in situ della sonda RPCI-5-1121A15 (segnale verde). A) Nucleo di cellule SK-N-BE; B) Metafase ottenuta da cellule SK-N-BE proliferative; C) nucleo di cellule SK-N-BE al 12° giorno di differenziamento.

Questi risultati mostrano che il gene *HLXB9* nelle cellule differenziate si trova in un compartimento del nucleo in cui la cromatina è più despiralizzata e più accessibile ai fattori di trascrizione e potrebbe perciò essere maggiormente espresso rispetto a ciò che accade nelle cellule proliferative in cui il gene si trova in un compartimento nucleare più periferico con cromatina compatta. Potrebbe subire, quindi, un'attivazione nel corso del differenziamento. Sono stati effettuati quindi esperimenti di Real Time PCR sui campioni di RNA estratti da cellule SK-N-BE in diversi momenti dall'induzione del differenziamento ed esperimenti di immunofluorescenza con anticorpo specifico diretto contro la proteina HB9. I risultati ottenuti dall'analisi di espressione con Real time PCR hanno messo in evidenza la presenza di mRNA del gene *HLXB9* principalmente nel quarto e quinto giorno del differenziamento, subendo poi un forte decremento al sesto giorno e scomparendo quasi del tutto dal settimo giorno fino al dodicesimo (Fig. 42).

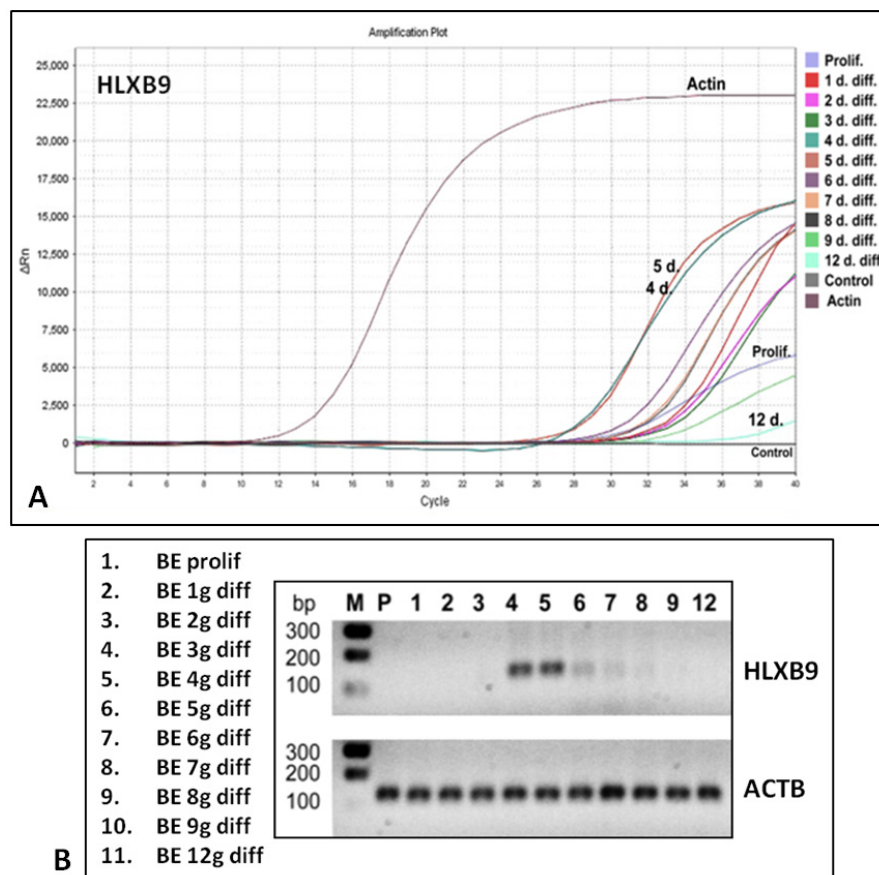
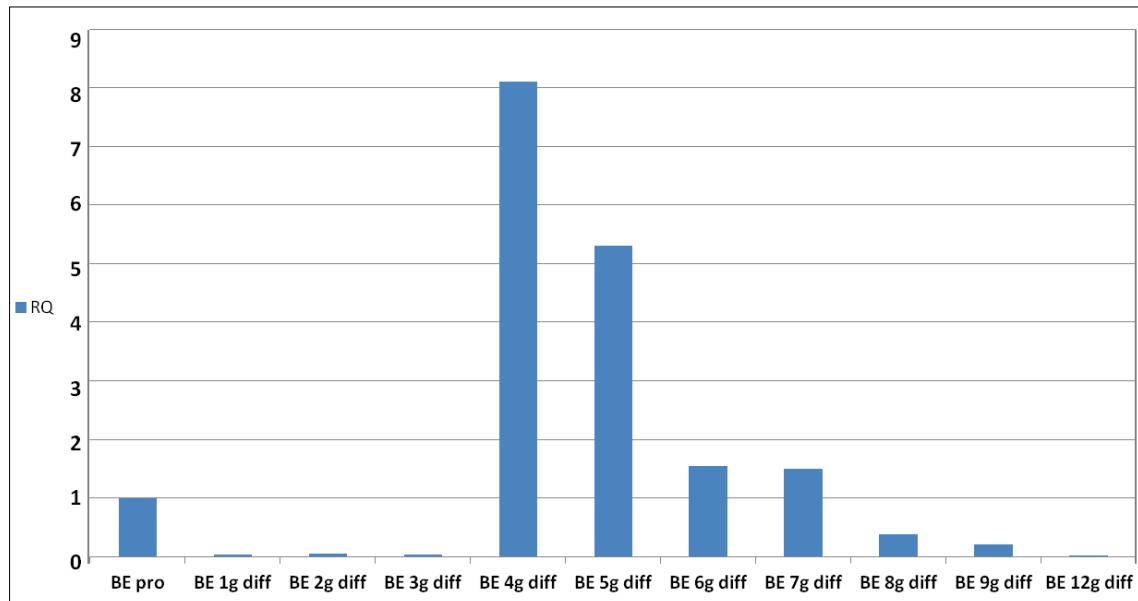


Fig. 42: A) Plot di amplificazione mediante real time del gene *HLXB9* su tutti gli stadi di differenziamento neurale con un controllo positivo (Actina) e un controllo negativo; B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati ottenuti.

Andando ad analizzare i dati ottenuti dal calcolo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ possiamo quantificare l'aumento di espressione di *HLXB9* nelle varie fasi di differenziamento. Rispettivamente nel quarto e nel quinto giorno assisteremo ad un aumento di otto volte e di cinque volte rispetto alle cellule in attiva proliferazione. I dati e il relativo istogramma sono mostrati in figura 43.



Campioni	Ct ACTB	Ct HLXB9	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
BE pro	16.72	31.8	16.08	0	1
BE 1g diff	14.86	31.7	16.84	0.76	0.59
BE 2g diff	14.80	31.28	16.47	0.39	0.76
BE 3g diff	14.38	31.27	16.89	0.81	0.57
BE 4g diff	14.15	27.21	13.06	-3.02	8.11
BE 5g diff	14.13	27.8	13.67	-2.41	5.31
BE 6g diff	14.37	29.82	15.45	-0.63	1.55
BE 7g diff	14.44	29.94	15.5	-0.58	1.49
BE 8g diff	14.38	31.8	17.42	1.4	0.38
BE 9g diff	14.42	32.8	18.38	2.3	0.20
BE 12g diff	14.32	36.7	22.38	6.3	0.01

Fig. 43: A sinistra i dati relativi ai calcoli del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ottenuto dai valori del Ct dei gene target (*HLXB9*) e del gene housekeeping (*ACTB*). In alto l'istogramma generato con i valori del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Si può notare l'incremento dell'espressione di *HLXB9* in corrispondenza del quarto e quinto giorno di differenziamento e il decremento nei giorni successivi

Anche i dati relativi all'immunofluorescenza con anticorpo specifico anti HB9 hanno confermato quelli ottenuti dall'analisi di espressione con Real time PCR. Risulta evidente che il segnale dell'anticorpo aumenta nel citoplasma delle cellule SK-N-BE al

quarto giorno di differenziamento. Inoltre le cellule al quinto giorno di differenziamento mostrano, oltre al segnale citoplasmatico, anche un segnale a livello nucleare, compatibile con la funzione di HB9 che è un fattore di trascrizione. Al sesto giorno si osserva invece un blando alone citoplasmatico paragonabile a quello osservato nelle cellule proliferative (Fig. 44).

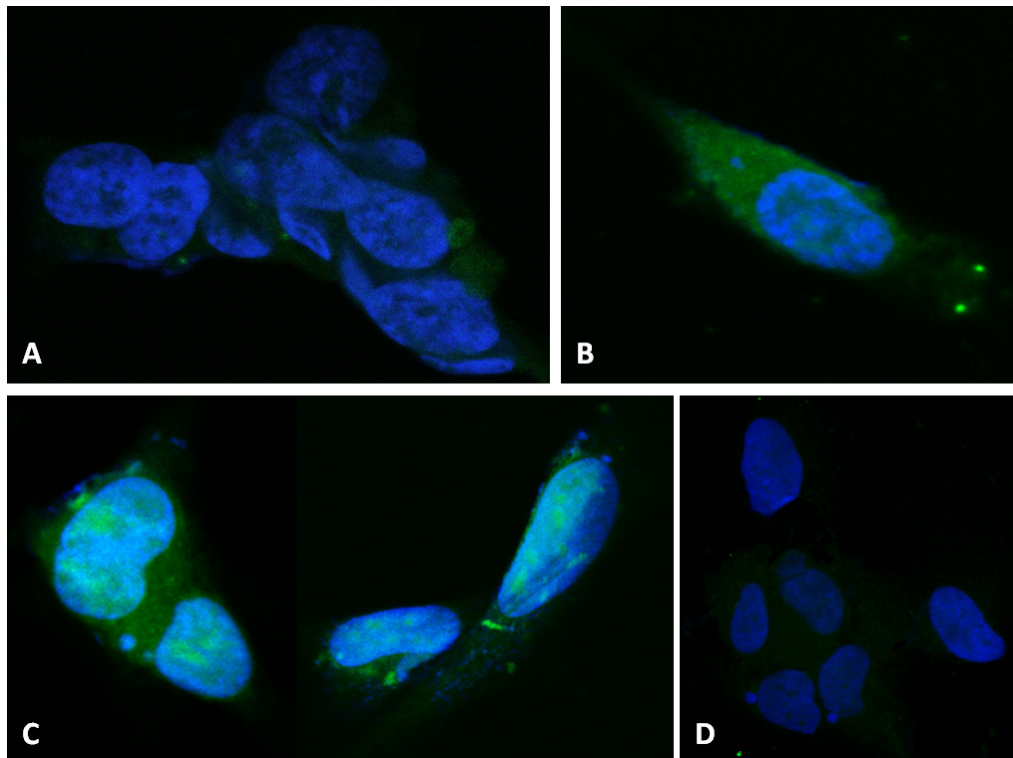


Fig. 44: Immunofluorescenza con anticorpo specifico per la proteina HB9 in cellule SK-N-BE; A) cellule proliferative; B) cellule al quarto giorno di differenziamento; C) cellule al quinto giorno di differenziamento; D) cellule al sesto giorno di differenziamento

Sembrerebbe quindi che *HLXB9* sia un gene coinvolto nelle prime fasi del differenziamento neurale e ciò potrebbe portare a considerarlo un marker del processo di sviluppo neurale dell'uomo, specifico per gli stadi iniziali.

La localizzazione nucleare di HB9 in regioni con cromatina decondensata (Fig. 44) è simile a quanto osservato nelle cellule della line GDM-1 e nei linfociti indotti con PHA (Fig. 29). Ma la funzione di HB9 sembrerebbe essere differente poiché nelle GDM-1 e nei linfociti il gene è attivo in cellule proliferative mentre nel caso delle SK-N-BE è attivo in cellule differenziate (nella fase iniziale).

Confrontando i dati di espressione di *HLXB9* ottenuti sulle cellule di tipo neuronale con quelli di marcatori noti e usati in letteratura per evidenziare l'avvenuto differenziamento neurale, come *GAP-43* e *MAPT* (Tau), si nota come essi abbiano un andamento molto diverso. Per quanto riguarda il gene *GAP-43*, i valori dei Ct dei singoli campioni, si sono rivelati molto simili, senza grossi cambiamenti circa il livello di espressione nel corso del differenziamento neuronale, tranne che per il 12° giorno di differenziamento dove si è riscontrato un aumento di quasi tre volte rispetto ai livelli di mRNA delle cellule proliferative (Fig. 45 e 46).

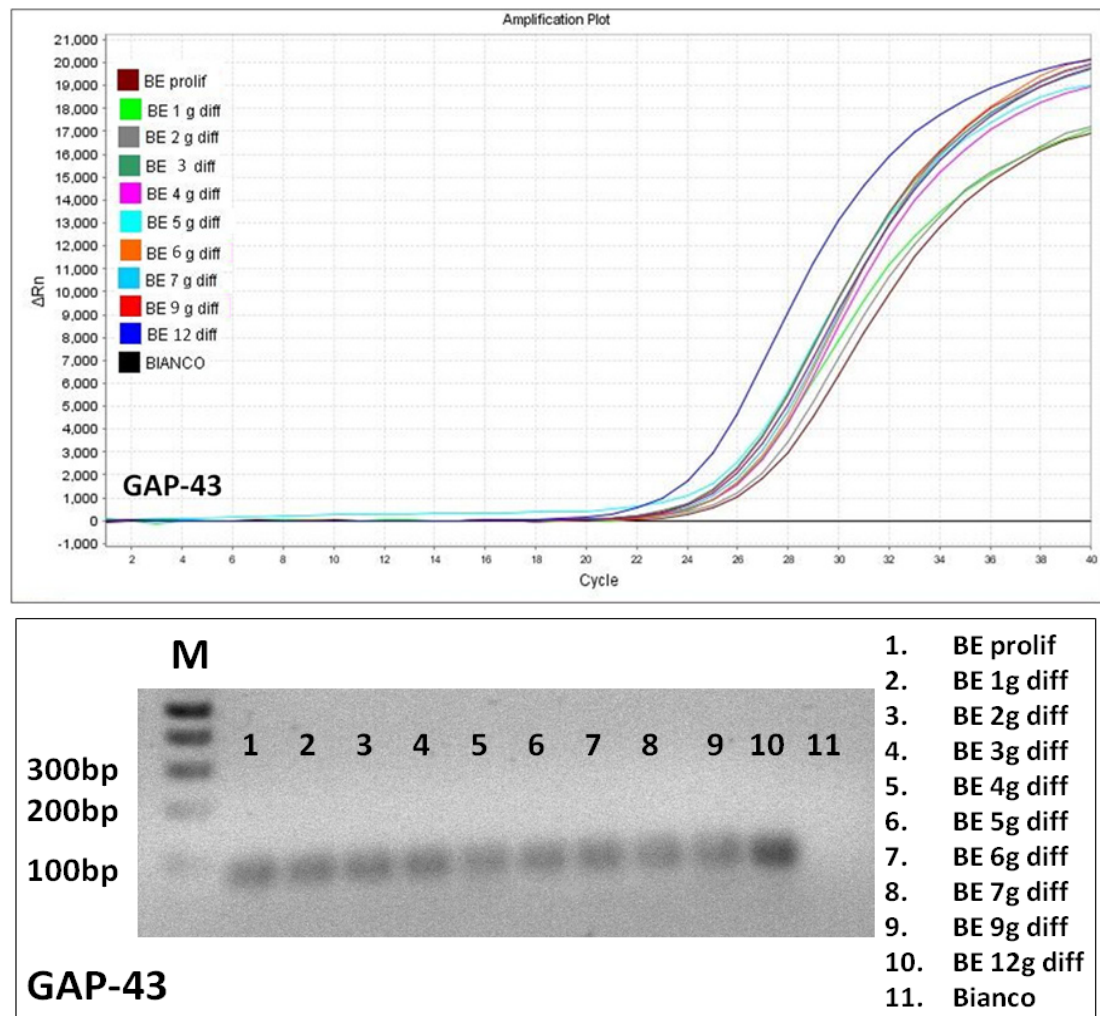
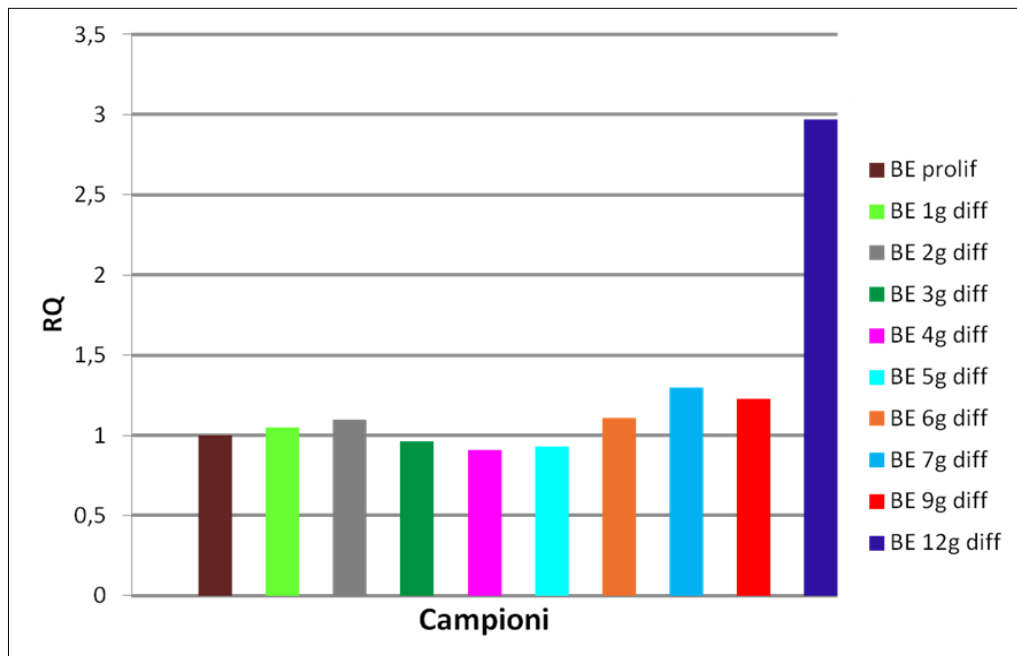


Fig. 45: A) Plot di amplificazione dell'esperimento di Real time del gene *GAP-43* su tutti gli stadi di differenziamento neuronale e di un controllo negativo indicato come *bianco*; B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati dell'analisi di espressione.

Campioni	Ct ACTB	Ct GAP-43	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
BE pro	16.72	27.8	12.08	0	1
BE 1g diff	14.96	26.96	12	-0.08	1.05
BE 2g diff	14.80	26.74	11.94	-0.14	1.10
BE 3g diff	14.38	26.52	12.14	0.06	0.96
BE 4g diff	14.15	26.36	12.21	0.13	0.91
BE 5g diff	14.13	26.31	12.18	0.1	0.93
BE 6g diff	14.37	26.30	11.93	-0.15	1.11
BE 7g diff	14.44	26.14	11.7	-0.38	1.30
BE 9g diff	14.42	26.20	11.78	-0.3	1.23
BE 12g diff	14.32	24.83	10.51	-1.57	2.97

Fig. 46: A sinistra i dati relativi ai calcoli del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. In basso l'istogramma basato sui valori del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Si può notare l'incremento dell'espressione di *GAP-43* in corrispondenza del dodicesimo giorno di differenziamento.



Per quanto riguarda il gene *MAPT*, valutando l'espressione in cellule SK-N-BE proliferative e in tutti gli stadi del differenziamento si assiste ad un graduale aumento dei livelli di mRNA con l'aumentare dei giorni di differenziamento cellulare. L'aumento risulta più evidente dal sesto giorno di differenziamento in poi. In figura 47 è mostrato il plot di amplificazione dell'espressione di *MAPT* in cellule proliferative, differenziate al sesto giorno e completamente differenziate, con il relativo gel elettroforetico; in figura 48 viene mostrato il relativo istogramma con i calcoli effettuati paragonando i valori dei Ct.

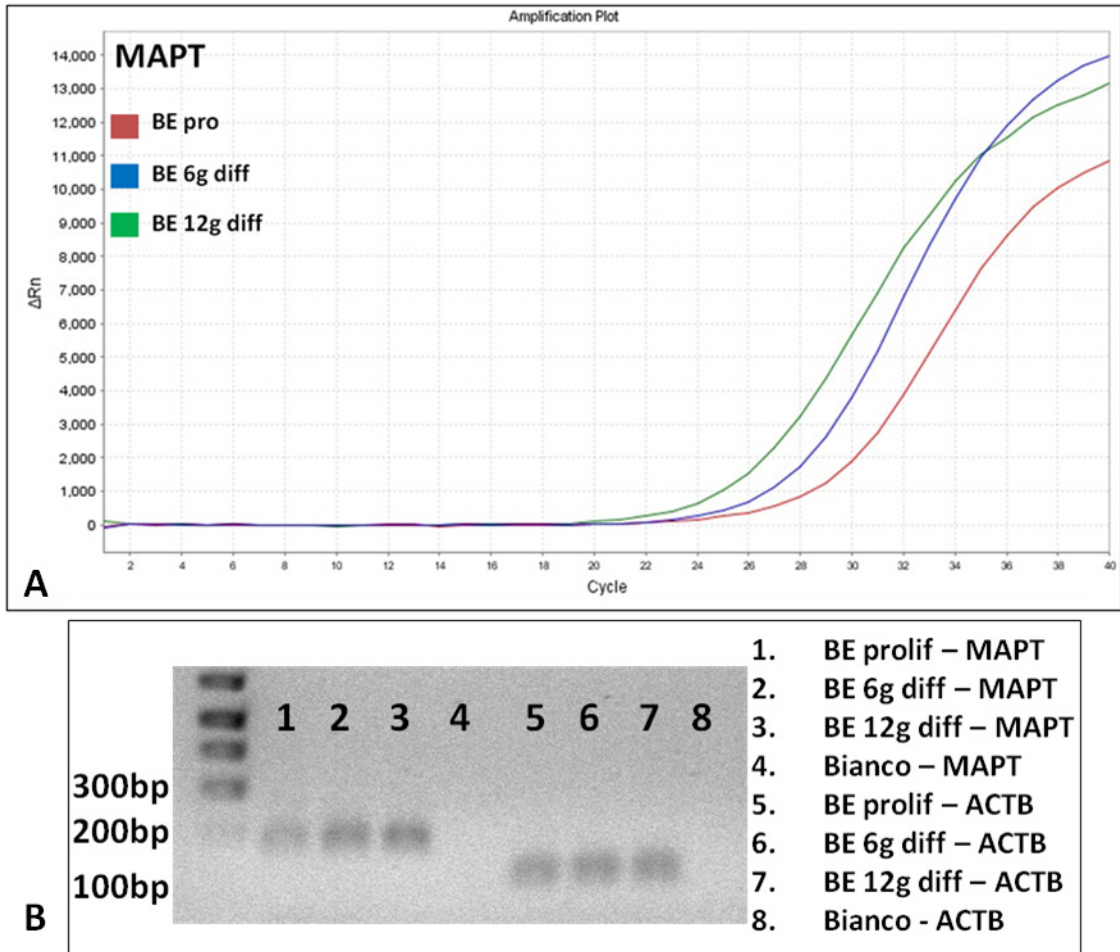


Fig. 47: A) Plot di amplificazione dell'esperimento di Real time del gene *MAPT* sui tre principali stadi di differenziamento neurale (cellule proliferative, cellule al sesto giorno di differenziamento e cellule al dodicesimo); B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati dell'analisi di espressione.

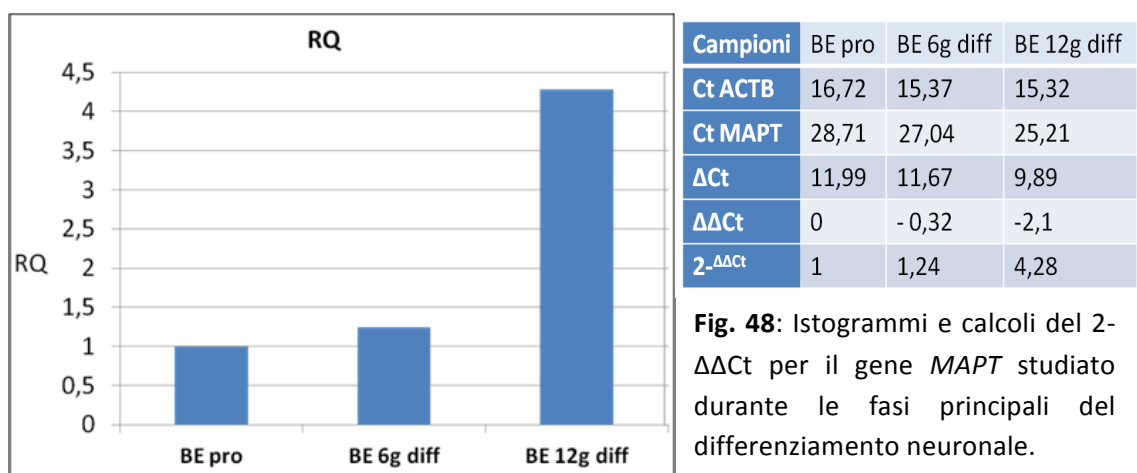


Fig. 48: Istogrammi e calcoli del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per il gene *MAPT* studiato durante le fasi principali del differenziamento neuronale.

Confrontando i dati di espressione dei geni *HLXB9*, *MAPT* e *GAP-43* si può affermare che, mentre i geni *MAPT* e *GAP-43* sono marcatori più specifici per individuare un neurone maturo ottenuto dopo l'avvenuto differenziamento neurale *in vitro*, il gene *HLXB9* potrebbe essere considerato un marcatore delle prime fasi del differenziamento, quando ancora la morfologia neuronale non è completamente delineata ma la crescita cellulare si è arrestata e le cellule cominciano l'allungamento neuritico e l'ingrandimento del corpo cellulare.

Possibili geni target della proteina HB9 in cellule nervose

Come per la linea GDM-1, anche sulle cellule SK-N-BE sono stati esaminati alcuni possibili geni target del fattore di trascrizione HB9. In particolare sono stati valutati il gene *PTGER2*, *MYC-N* e *ZYX* per verificare una eventuale repressione o attivazione del gene coincidente con i giorni di maggiore espressione di *HLXB9*. I primer scelti per i possibili target e le loro caratteristiche sono elencati in tabella 5.

Tabella 5: caratteristiche dei primer *PTGER2*, *MYCN* e *ZYX*

Gene	Forward	Reverse	Tm°	Amplificato
PTGER2	CTTGCCTTTCACGATTTTTG	AAAAACCTAAGAGCTTGGAG	60°	81 bp
MYCN	GAGCGATTCAGATGATGAAG	TCGTTTGAGGATCAGCTC	60°	176 bp
ZYX	ACCCTGGAGAAGTGTAAC	TACTGCTTGTGGTAGTCG	54°	179 bp

I risultati dell'analisi di espressione mediante Real Time PCR mostrano, al contrario di quello che accade con la linea GDM-1, che *PTGER2* non è un bersaglio di *HLXB9*. Infatti il gene è espresso durante tutto il periodo di differenziamento cellulare, con un aumento nel corso del differenziamento (Fig. 49).

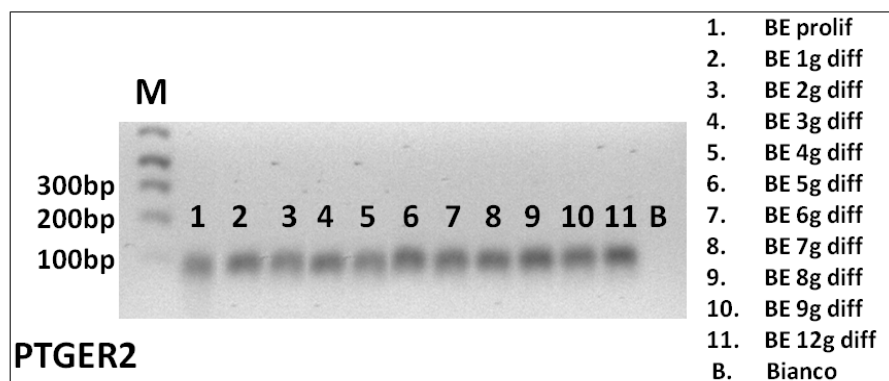
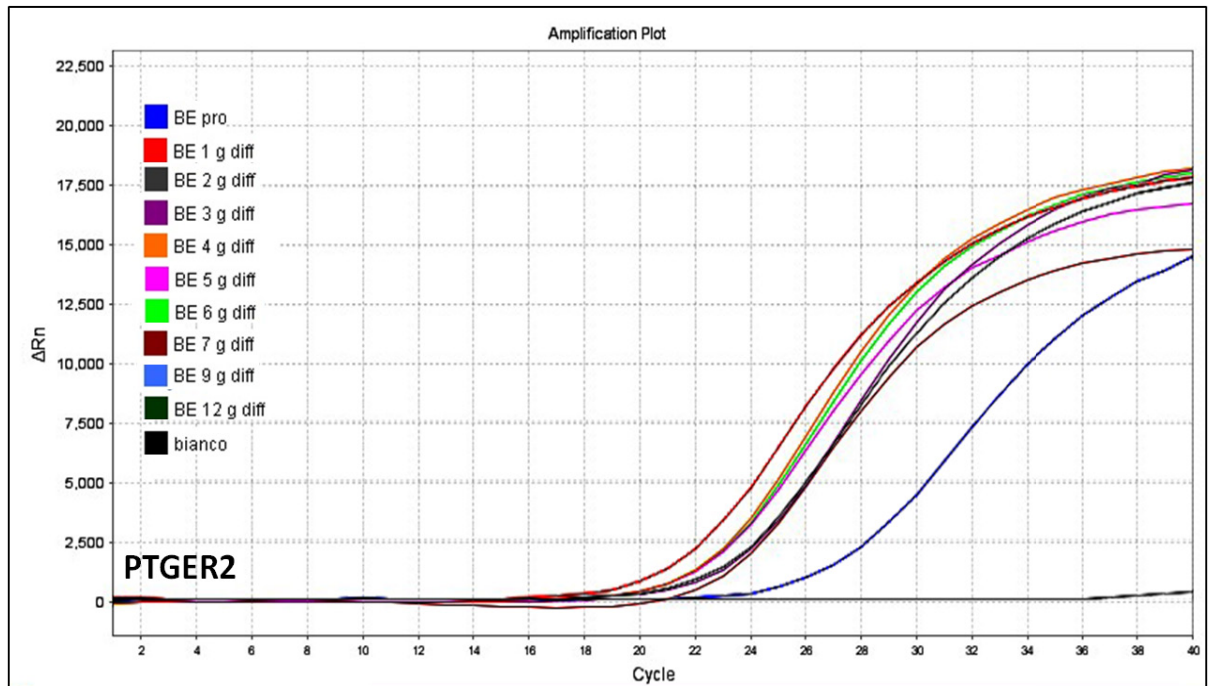


Fig.49: A) Plot di amplificazione dell'esperimento di Real time del gene *PTGER2* testato su tutte le giornate di differenziamento neurale (cellule proliferative, cellule dal primo giorno al dodicesimo di differenziamento); B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati dell'analisi di espressione.

Successivamente è stato valutato il gene *MYC-N*, implicato nella proliferazione e nella crescita tumorale. L'espressione di *MYC-N* nelle SK-N-BE proliferative è molto elevata ma si riduce gradualmente durante il corso del differenziamento neuronale, sebbene non si riscontri nessun legame con il periodo di maggiore espressione di *HLXB9* (Fig. 50).

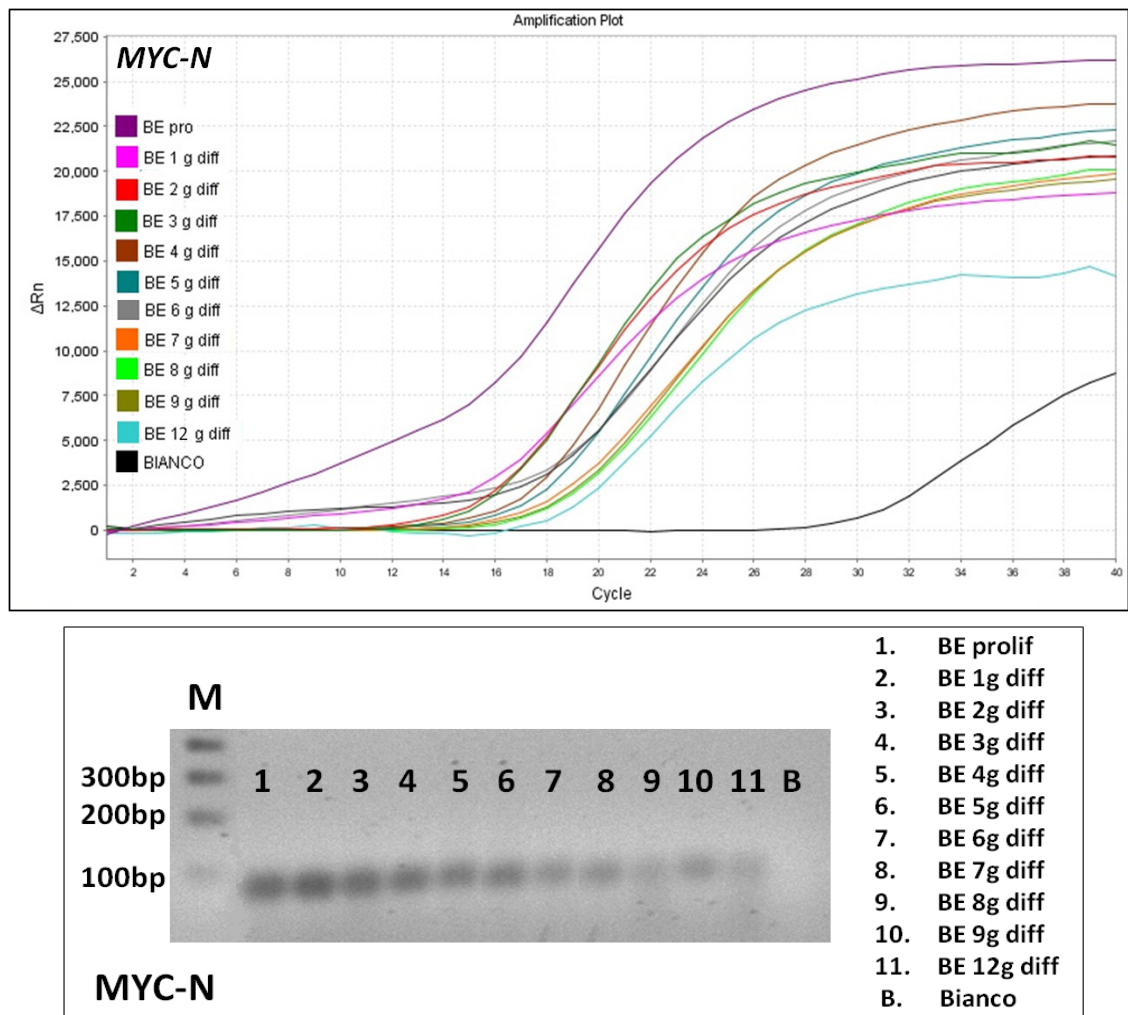


Fig. 50: A) Plot di amplificazione dell'esperimento di Real time del gene *MYC-N* su cellule SK-N-BE proliferative e durante gli stadi di differenziamento; B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati dell'analisi di espressione.

Infine è stato valutato il gene *ZYX*, poiché esso è stato considerato in precedenti ricerche un possibile bersaglio dell'azione di *HLXB9*. Dai risultati ottenuti nel presente lavoro tale legame non è riscontrato, essendo il gene *ZYX* presente sia nelle SK-N-BE proliferative che nelle cellule in differenziamento, senza grosse alterazioni di espressione (Fig. 51).

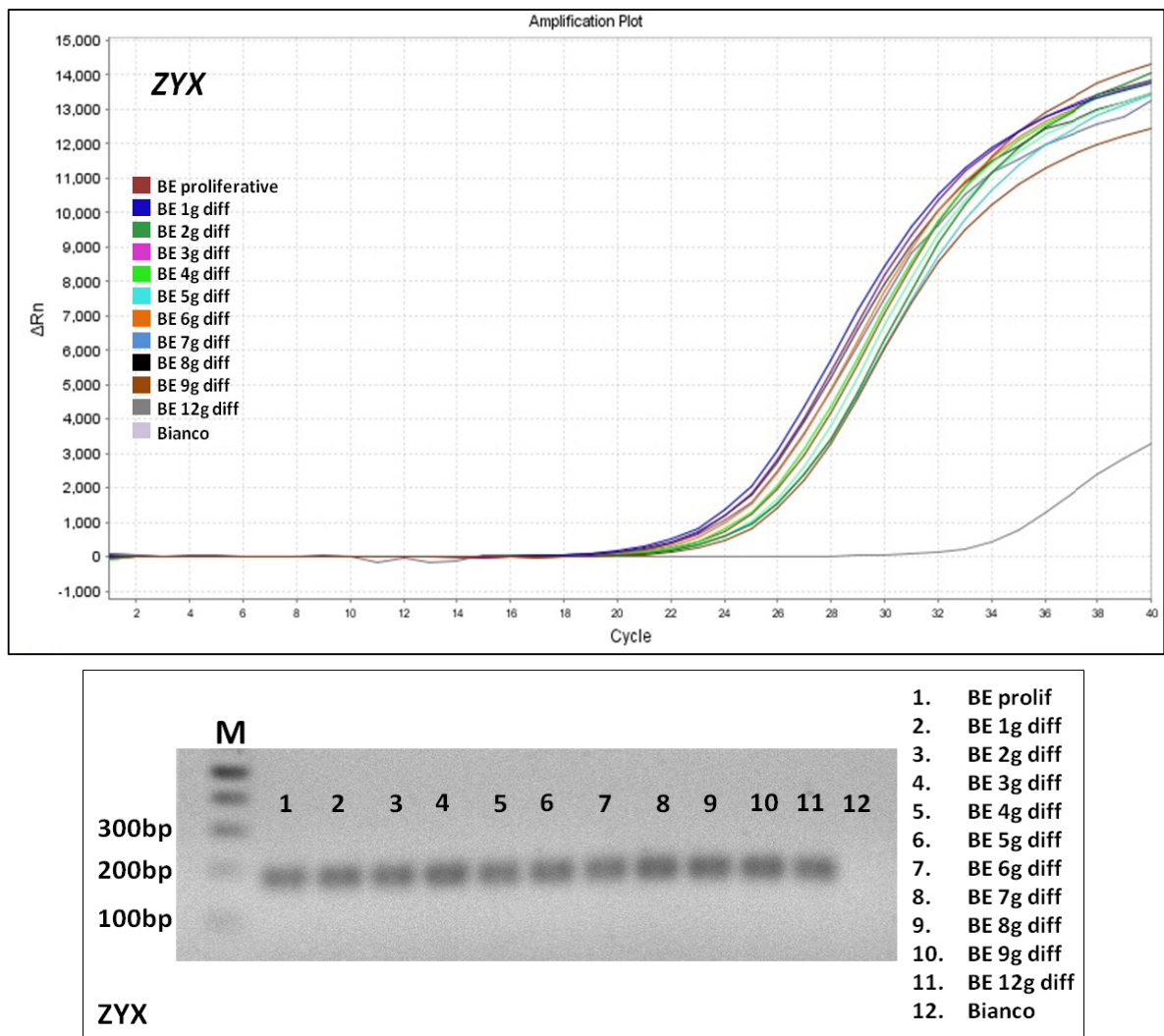


Fig. 51: A) Plot di amplificazione dell'esperimento di Real time del gene ZYX su tutti gli stadi di differenziamento neurale; B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati dell'analisi di espressione.

È evidente quindi che a seconda della tipologia cellulare presa in esame, cellule ematopoietiche o nervose, i target e l'azione di *HLXB9* siano molto diversi. Basti pensare, per esempio, che nelle cellule ematopoietiche il gene si riattiva durante la progressione tumorale e nelle cellule allo stadio di blasti, supponendo quindi un coinvolgimento nell'aspetto proliferativo. Invece nelle cellule neuronali è attivato nei processi di differenziamento, proprio nelle fasi iniziali di arresto della proliferazione cellulare e di definizione del fenotipo neurale.

Localizzazione intranucleare ed espressione di HLXB9 durante l'apoptosi

Il fenomeno della morte cellulare è una caratteristica importante dello sviluppo del sistema nervoso e gioca inoltre un ruolo fondamentale in alcune patologie neurodegenerative.

La morte cellulare per apoptosi delle cellule SK-N-BE proliferative e differenziate è stata indotta aggiungendo al terreno di coltura una nota sostanza con caratteristiche apoptogeniche, la Staurosporina, testando diverse concentrazioni e vari tempi di azione. Gli effetti della sostanza risultano molto più marcati quando essa è aggiunta in cellule già differenziate ma, in generale, la Staurosporina provoca il restringimento del corpo cellulare ed una rapida degenerazione del neurite con attenuazione e retrazione dei processi neuronali e assonici, caratteristiche tipiche della neurotossicità.

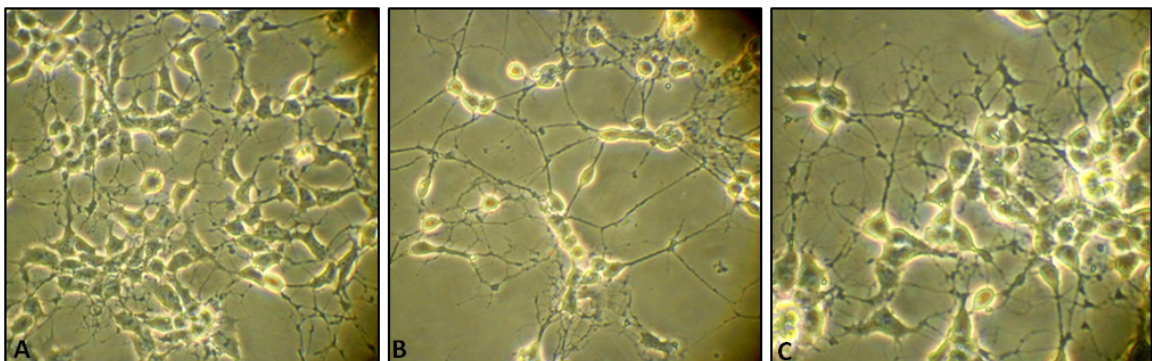


Fig. 52: A) Cellule SK-N-BE proliferative trattate con STS 100nM per 1h; B) Cellule SK-N-BE differenziate trattate con STS 100nM per 1h; C) Cellule SK-N-BE proliferative trattate con STS 300nM per 1h.

Inoltre dopo circa 2 ore di trattamento con Staurosporina molti nuclei delle cellule SK-N-BE, colorati con DAPI, mostrano la frammentazione nucleare tipica delle fasi finali dell'apoptosi (Fig. 53).

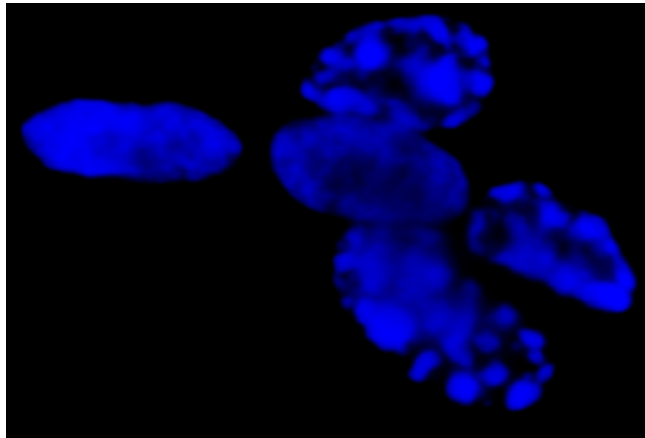


Fig. 53: nuclei in apoptosi di cellule SK-N-BE trattate con STS 100 nM per due ore.

È stata valutata l'espressione del gene *HLXB9* mediante Real time PCR in alcuni momenti della morte cellulare per apoptosi indotta dalla Staurosporina a varie concentrazioni e tempi (Fig. 54).

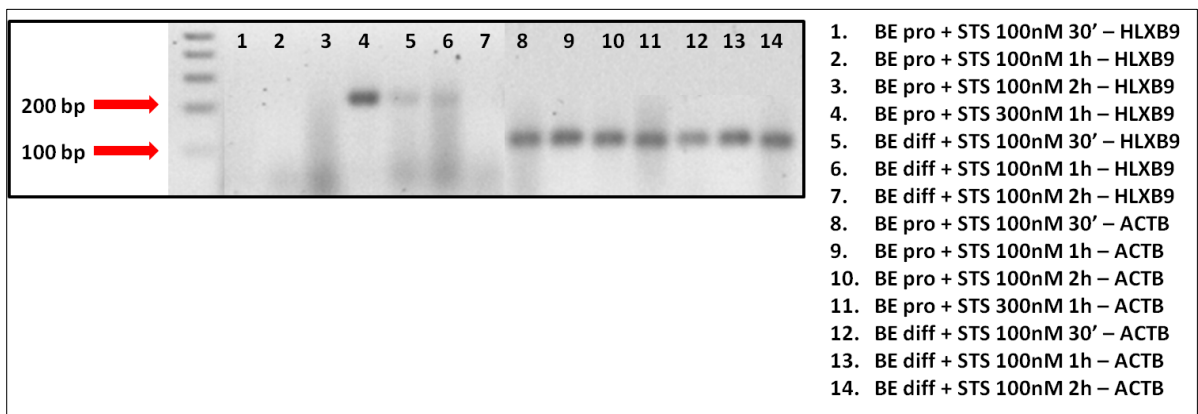


Fig. 54: Elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in cui sono caricati gli amplificati ottenuti dalla Real time PCR con primer per *HLXB9* (amplificato di 205 bp) su cellule SK-N-BE proliferative e differenziate con varie concentrazioni e tempi di STS. In evidenza il risultato, nella quarta line, delle cellule proliferative trattate con STS 300 nM.

Effettuando queste analisi di espressione è risultato interessante il dato di *HLXB9* sulle cellule SK-N-BE proliferative trattate con Staurosporina 300 nM per un'ora, il quale è stato poi approfondito trattando le cellule con la stessa concentrazione di STS ma per tempi diversi, venti minuti, un'ora e due ore. I risultati ottenuti mostrano che *HLXB9* viene espresso già nei venti minuti di trattamento, raggiungendo il massimo in un'ora e diminuendo la sua espressione alle due ore di trattamento (Fig. 55).

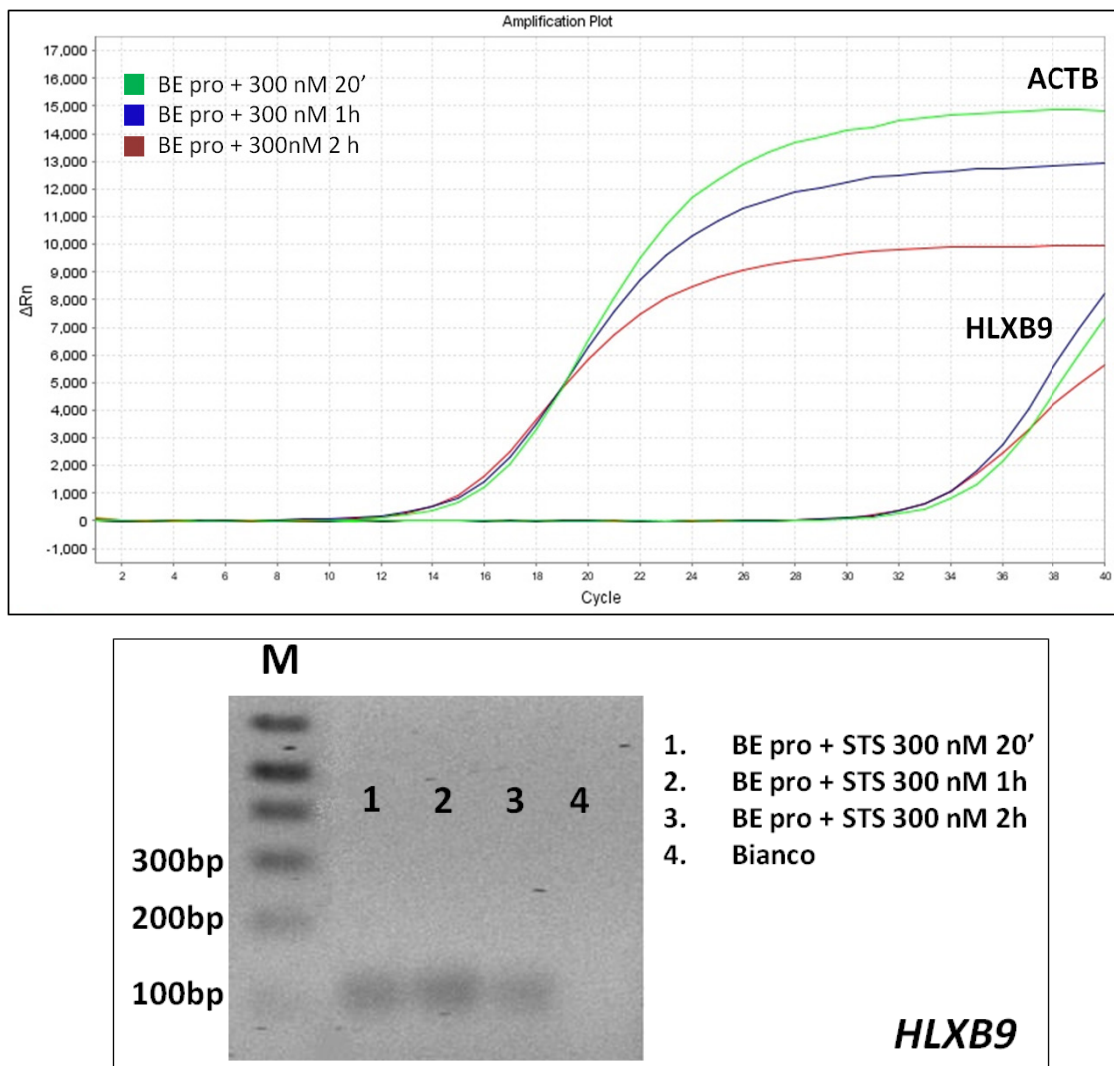


Fig. 55: A) Plot di amplificazione dell'esperimento di Real time PCR del gene *HLXB9* e di un gene di controllo, *ACTB*, sulle SK-N-BE proliferative trattate con STS 300nM per 20', 1h e 2h; B) corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% degli amplificati del gene *HLXB9* ottenuti dall'analisi di espressione.

Inoltre nelle cellule SK-N-BE proliferative trattate con Staurosporina 300 nM per un'ora è stata effettuata la localizzazione intranucleare del gene *HLXB9*, mediante ibridazione fluorescente *in situ* con sonda RPCI-5-1121A15 che contiene l'intero gene. La localizzazione ha mostrato come *HLXB9* modifichi la sua posizione intranucleare trovandosi in una regione periferica nelle stesse cellule senza trattamento, e spostandosi poi in una regione più interna nel nucleo delle cellule trattate. Mediante l'analisi bidimensionale dei segnali di ibridazione è stato possibile infatti calcolare le mediane dei valori di localizzazione ottenuti su tutti i nuclei collezionati e appurare che

la mediana per le SK-N-BE proliferative trattate con Staurosporina 300 nM è di 0,604 (locus nella regione interna del nucleo) rispetto a quella delle cellule di controllo che è pari a 0,73 (locus alla periferia nucleare).

Questo risultato lascia spazio a più interpretazioni: è possibile che la Staurosporina ad alte concentrazioni attivi dei meccanismi paragonabili a quelli attuati dall'acido retinoico nelle cellule in differenziamento nel momento in cui viene espresso *HLXB9*. Oppure, dato che in letteratura è descritta l'attivazione delle caspasi e l'induzione dell'apoptosi anche a concentrazioni di Staurosporina inferiori a 50 nM, potrebbe essere ipotizzato un possibile coinvolgimento di *HLXB9* proprio nel processo apoptotico.

3.3 Il gene *HLXB9* nelle cellule linfoblastoidi dei Primati

La localizzazione intranucleare del gene *HLXB9* è stata rilevata in varie linee linfoblastoidi di primati non umani. Sono state effettuate delle ibridazioni *in situ* con la sonda PAC RPCI-5-1121A15 su cellule della linea linfoblastoide delle seguenti specie:

- *Gorilla gorilla* (GGO)
- *Pan troglodytes* (PTR)
- *Macaca mulatta* (MMU)
- *Presbytis cristata* (PCR)
- *Pan pygmaeus* (PPY)

Le specie GGO, PTR, PPY appartengono al sottordine degli Hominoidea a cui appartiene anche l'uomo. Le specie MMU e PCR appartengono invece ai Cercopithecoidea, dette anche scimmie del Vecchio Mondo (Fig. 56).

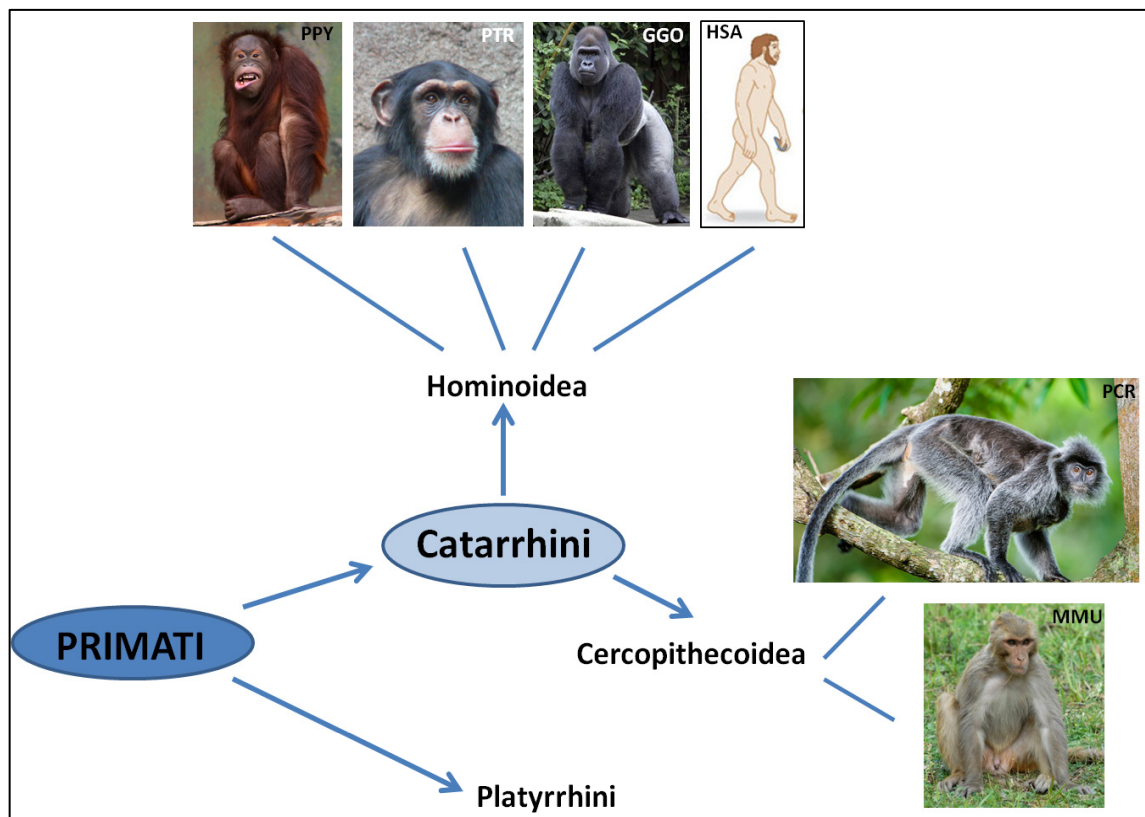


Fig. 56: Rapporti filogenetici delle specie utilizzate nel presente studio.

Le immagini delle metafasi di PPY, MMU e PCR ibridate con la sonda RPCI-5-1121A15, marcata con biotina e rilevata con avidina-FITC, sono illustrate in figura 57. I segnali sono entrambi sul telomero del cromosoma 7 come avviene nel cromosoma 7 umano in cui il gene è localizzato nella banda 7q36.3.

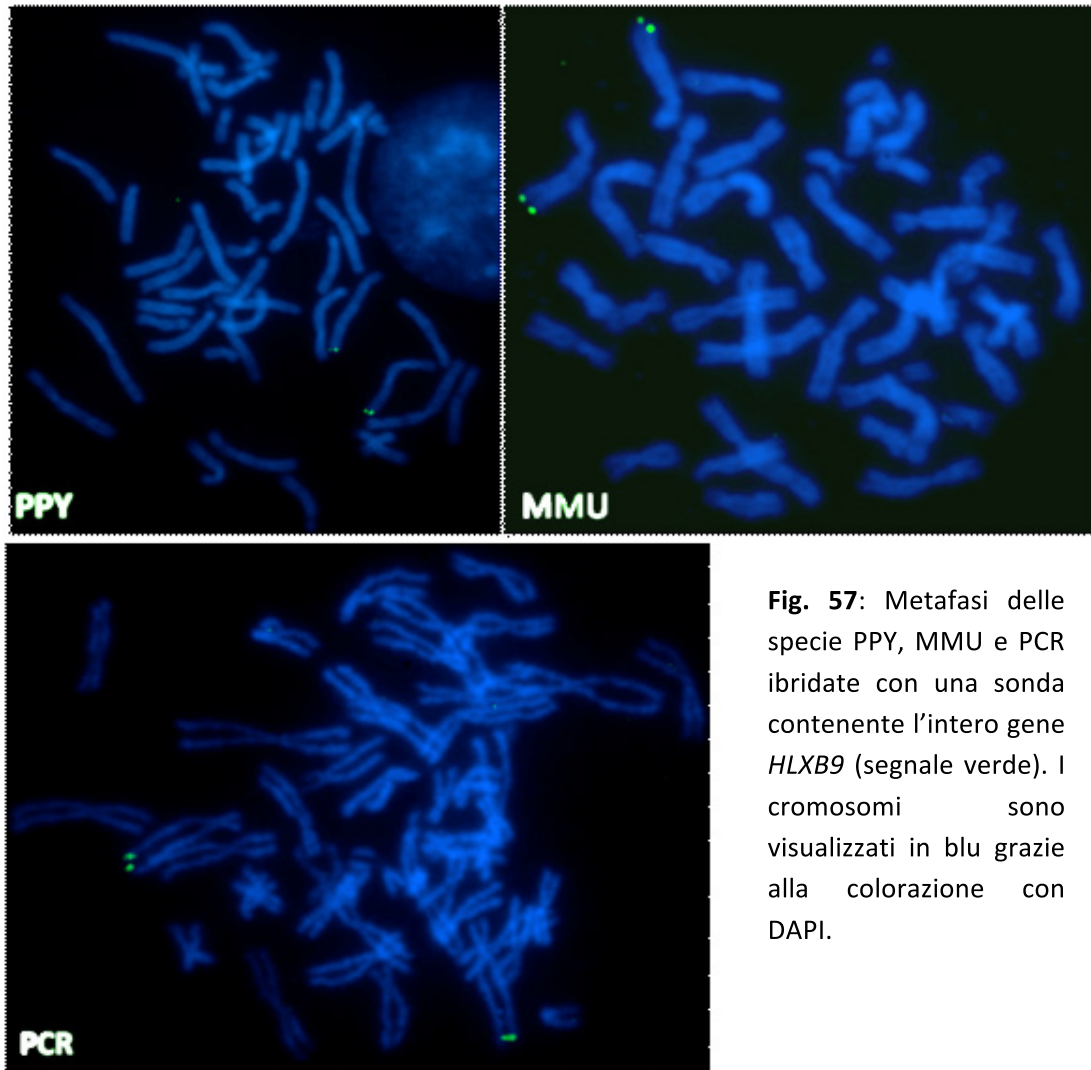


Fig. 57: Metafasi delle specie PPY, MMU e PCR ibridate con una sonda contenente l'intero gene *HLXB9* (segnale verde). I cromosomi sono visualizzati in blu grazie alla colorazione con DAPI.

Inoltre è stata valutata la localizzazione intranucleare del gene mediante ibridazione in situ e analisi bidimensionale. I risultati non hanno mostrato cambiamenti di localizzazione significativi rispetto al gene umano, in quanto i segnali corrispondenti al gene *HLXB9*, nelle tre specie considerate, sono tutti localizzati alla periferia nucleare con una mediana maggiore di 0,65 (Tabella 6).

Tabella 6: Valori di mediana del gene *HLXB9* nelle specie di Primati in studio.

Specie	HSA	PPY	MMU	PCR
Mediana	>0,65	0,778	0,726	0,735

Una situazione differente si è verificata con le cellule di GGO e con le cellule di PTR.

Nella specie *Gorilla gorilla* il segnale non si è presentato specifico per il cromosoma 7. Le metafasi e i nuclei, infatti, possiedono quattro segnali distinti, due sul cromosoma 7 e due su un cromosoma appartenente al gruppo A (Fig. 58). Di conseguenza la mediana non è stata calcolata.

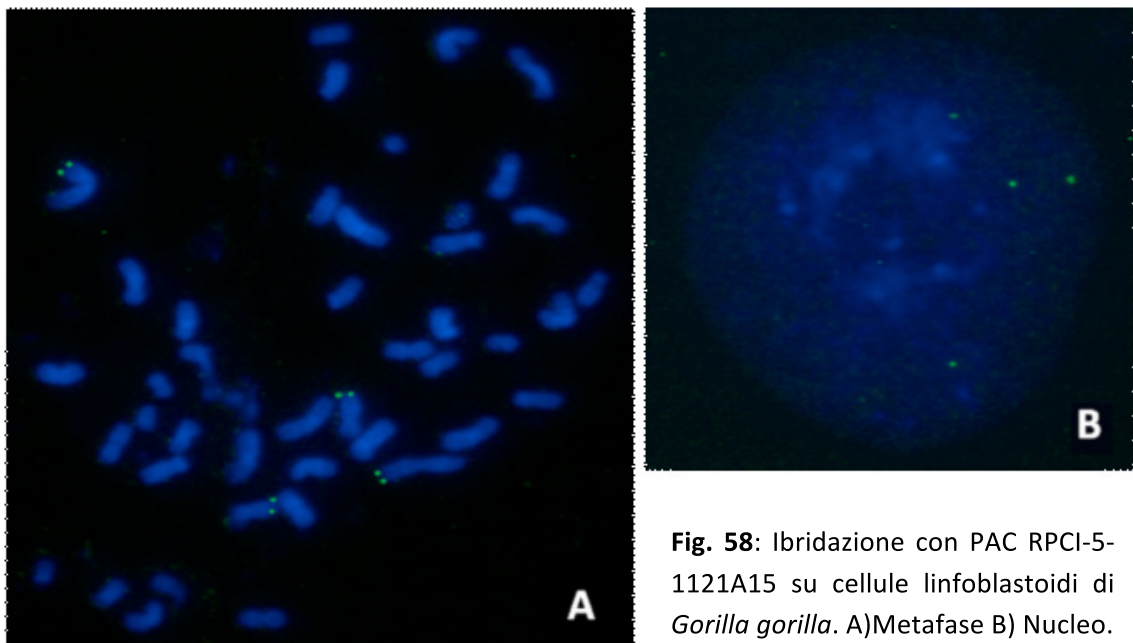


Fig. 58: Ibridazione con PAC RPCI-5-1121A15 su cellule linfoblastoidi di *Gorilla gorilla*. A) Metafase B) Nucleo.

Infine nella specie *Pan troglodytes* (PTR) l'ibridazione con il PAC RPCI-5-1121A15 mostra un unico segnale su un solo cromosoma 7 (Fig. 59). Tali segnali sono stati raccolti e analizzati ed il valore di mediana è risultato essere di 0,692, quindi ancora una volta periferico.

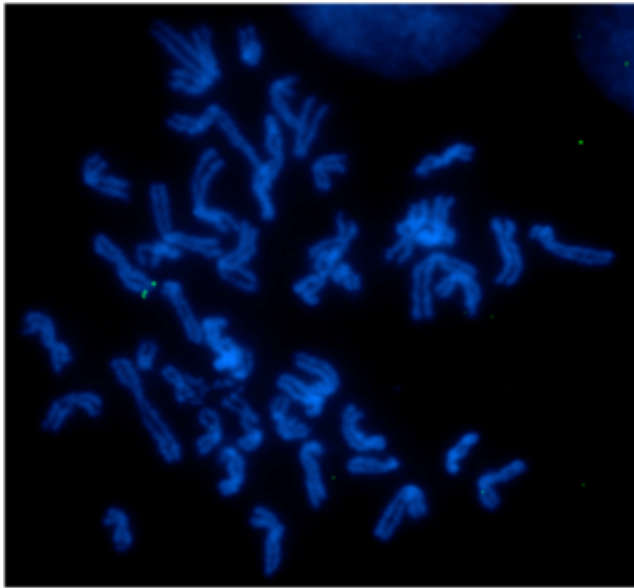


Fig. 59: Ibridazione con PAC RPCI-5-1121A15 su una metafase di cellule linfoblastoidi di *Pan troglodytes*.

I dati ottenuti con le cellule linfoblastoidi delle specie di Primati non umani prese in esame ci indicano che il locus di *HLXB9* è quasi sempre localizzato sul telomero del cromosoma 7 ed inoltre si trova alla periferia del nucleo, indicando il mantenimento della posizione intranucleare linfocitaria nel corso dell'evoluzione e un'assenza di espressione del gene che trovandosi alla periferia nucleare non sarà trascritto.

4. Conclusioni

I cromosomi sono posizionati nel nucleo in interfase in maniera non casuale: essi presentano una distribuzione radiale dalla periferia all'interno del nucleo, in modo tale da avere le regioni cromosomiche più ricche in AT posizionate nella parte più periferica e le regioni più ricche in GC nella parte più interna del nucleo. Alcune situazioni patologiche sono associate a cromosomi che hanno subito una modificazione della loro posizione intranucleare che si riflette in una alterazione dell'espressione genica. L'organizzazione della cromatina, infatti, è un fattore che influenza la trascrizione genica in tutti i momenti della vita di una cellula e in particolar modo durante il differenziamento cellulare che prevede un'attività trascrizionale finemente regolata.

Infatti, la specificazione dell'identità cellulare deriva da molti fattori che impongono uno specifico profilo trascrizionale ai progenitori delle varie tipologie cellulari, generando così il loro fenotipo differenziato.

Spesso i riarrangiamenti cromosomici che caratterizzano alcune patologie tumorali portano alla formazione di trascritti anomali. In alcuni casi, invece, i riarrangiamenti cromosomici sono associati ad una riorganizzazione della cromatina che, determinando un riposizionamento genico all'interno del nucleo, comporta una deregolazione dell'espressione dei geni coinvolti; infatti, un riposizionamento intranucleare di specifici geni, non associato a mutazioni della sequenza nucleotidica, può modificarne comunque la funzionalità.

Nella presente tesi è stato preso in considerazione il gene *HLXB9* per valutare gli effetti della sua rilocalizzazione a livello nucleare in cellule ematopoietiche tumorali e non e in cellule neuronali durante varie fasi di sviluppo e differenziamento.

I dati ottenuti indicano che esiste una correlazione significativa fra i cambiamenti della posizione intranucleare del gene *HLXB9* e quelli dei relativi livelli di espressione genica. Inoltre, dall'analisi dei livelli di espressione di geni regolati da *HLXB9*, è stato possibile notare che l'azione del gene sembra essere duplice e molto diversa a seconda della tipologia cellulare considerata. Nelle cellule ematopoietiche una riattivazione del gene *HLXB9*, normalmente silente nei linfociti differenziati, sembra essere coinvolta nella proliferazione cellulare che caratterizza alcune tipologie di cellule leucemiche ma anche i blasti linfocitari. Nelle cellule di neuroblastoma SK-N-BE, invece, il gene *HLXB9* sembra avere un ruolo nell'arresto della proliferazione cellulare, essendo espresso in

modo specifico nelle fasi iniziali del differenziamento neuronale indotto da acido retinoico. Questa specificità potrebbe fare di *HLXB9* un marcatore ottimale per evidenziare le prime fasi di differenziamento di una cellula nervosa non ancora matura.

La diversa azione del gene *HLXB9* riscontrata nelle tipologie cellulari prese in esame potrebbe essere spiegata dai target su cui il fattore di trascrizione HB9 agisce: per le cellule ematopoietiche è stato individuato il gene *PTGER2* come possibile bersaglio, situazione che non è stata riscontrata nelle cellule SK-N-BE differenziate.

La possibilità di utilizzare le linee cellulari *in vitro* ha rappresentato in questo lavoro un grande vantaggio per studiare il processo di differenziamento ma anche la riorganizzazione della cromatina e l'alterata differenziazione cellulare che caratterizza certe patologie tumorali. Inoltre, avere a disposizione un modello di sviluppo nervoso *in vitro* ha permesso di valutare i cambiamenti di localizzazione intranucleare e i livelli di espressione di *HLXB9* in molti stadi del differenziamento e, per ultimo, nell'apoptosi indotta da Staurosporina. Il suddetto modello cellulare *in vitro* (cellule replicative > cellule differenziate > cellule apoptotiche) può rappresentare un valido strumento per valutare l'espressione di qualsiasi gene implicato nello sviluppo dei neuroni e di valutarne la correlazione con la riorganizzazione cromatinica. Inoltre, assimilando gli stress ossidativi provocati dalla sostanza apoptogena Staurosporina, utilizzata in questa ricerca, a quelli presenti in diverse malattie neuro-degenerative come Alzheimer o morbo di Parkinson potrebbe essere vantaggioso saggiare molecole farmacologiche in grado di arrestare o di migliorare i danni provocati dalla sostanza.

Infine i dati di localizzazione intranucleare di *HLXB9* ottenuti sulle linee linfoblastoidi di Primati non umani ci indicano che il gene ha mantenuto la sua localizzazione sia a livello cromosomico, mantenendosi sul telomero del cromosoma 7, sia a livello intranucleare mantenendo una posizione costante alla periferia del nucleo. Questo evidenzia indirettamente come anche la funzione della proteina HB9 codificata dal gene *HLXB9* sia evolutivamente conservata.

Bibliografia

- Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P: *Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice*. Cell **83**(2): 269-78, 1995.
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S: *Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity*. Neuron **23**: 659– 674, 1999.
- Arkhipova V, Wendik B, Devos N, Ek O, Peers B, Meyer D: *Characterization and regulation of the hb9/mnx1 beta-cell progenitor specific enhancer in zebrafish*. Dev Biol **365**(1): 290-302, 2012.
- Arrasate M, Perez M, Avila J: *Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane*. Neurochem Res **25**: 43-50, 2000.
- Ballabio E, Cantarella CD, Federico C, Di Mare P, Hall G, Harbott J, Hughes J, Saccone S, Tosi S: *Ectopic expression of the HLXB9 gene is associated with an altered nuclear position in t(7;12) leukaemias*. Leukemia **23**(6): 1179-82, 2009.
- Barco A and Kandel ER: *The role of CREB and CBP in brain function*. Transcription Factors in the Nervous System (Thiel ed.), pp. 207–241, Wiley-VCH Verlag, 2006.
- Bartova E, Kozubek S, Kozubek M, Jirsova P, Lukasova E, Skalnikova M, et al.: *Nuclear topography of the c-myc gene in human leukemic cells*. Gene **244**: 1–11, 2000.
- Bårtová E, Krejčí J, Harnicarová A, Kozubek S: *Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci*. Differentiation **76**: 24–32, 2008.
- Ben-Bassat H, Korkesh A, Voss R, Leizerowitz R, Polliack A: *Establishment and characterization of a new permanent cell line (GDM-1) from a patient with myelomonoblastic leukemia*. Leukemia Research **6**: 743–752, 1982.
- Benowitz LI, Routtenberg A: *GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity*. Trends Neurosc **20**: 84–91, 1997.

-
- Bergeron SE, Zhu M, Thiem SM, Friderici KH, Rubenstein PA: *Ion-dependent polymerization differences between mammalian beta- and gamma-nonmuscle actin isoforms*. J Biol Chem. **285**(21): 16087-95, 2010.
 - Beverloo HB, Panagopoulos I, Isaksson M, van Wering E, van Drummen E, de Klein A, Johansson B, Slater R: *Fusion of the homeobox gene HLXB9 and ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13)*. Cancer Res **61**: 5374-5377, 2001.
 - Bibbel M, Richter J, Schrenk K, Tucker KL, Staiger V, Korte M, Goetz M, Barde YA: *Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage*. Nat. Neurosci. **7**: 1003-1009, 2004.
 - Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS: *Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones*. Cancer Research **38**: 3751-3757, 1978.
 - Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, et al.: *Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones*. Cancer Res **38**: 3751-3757, 1978.
 - Boix J, Llecha N, Yuste V, Comella V: *Characterization of the Cell Death Process Induced by Staurosporine in Human Neuroblastoma Cell Lines*. Neuropharmacology **36**(6): 811–821, 1997.
 - Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA: *The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerimutant cells*. Human Molecular Genetics **10**(3): 211-219, 2001.
 - Breit S, Ashman K, Wilting J, Rössler J, Hatzi E, Fotsis T et al.: *The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A*. Cancer Res. **60**: 4596–4601, 2000.
 - Bunnell T, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM: *Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool*. Molecular Biology of the Cell **22**, 2011.
 - Casolia T, Di Stefano G, Fattoretta P, Solazzia M, Delfino A, Biagini G, Bertoni-Freddari C: *GAP-43 mRNA detection by in situ hybridization, direct and indirect in situ RT-PCR in hippocampal and cerebellar tissue sections of adult rat brain*. Micron **34**, 415–422, 2003.
 - Castilla LH, Perrat P, Martinez NJ, Landrette SF, Keys R, Oikemus S, Flanagan J, Heilman S, Garrett L, Dutra A, Anderson S, Pihan GA, Wolff L, Liu PP:

Identification of genes that synergize with Cbfb–MYH11 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci USA **101**:4924–4929, 2004.

- Cheever TR, Li B, Ervasti JM: *Restricted Morphological and Behavioral Abnormalities following Ablation of b-Actin in the Brain.* PLoS ONE **7**(3), 2012.
- Chun KS, Lao HC, Trempus CS, Okada M, Langenbach R: *The prostaglandin receptor EP2 activates multiple signaling pathways and beta-arrestin1 complex formation during mouse skin papilloma development.* Carcinogenesis **30**(9): 1620-1627, 2009.
- Clemente IC, Ponsa M, Garcia M, Egozcue J: *Evolution of the Simiiformes and the phylogeny of human chromosomes.* Hum. Genet. **84**(6):493-506, 1990.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW: *Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin.* J Mol Biol **116**: 207-225, 1977.
- Cockell M, Gasser SM: *Nuclear compartments and gene regulation.* Curr Opin Genet Dev. **9**: 199-205, 1999.
- Cremer M, KüpperK, Wagler B, Wizelman L, V. Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T: *Inheritance of gene density–related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei.* The Journal of Cell Biology **162**(5): 809–820, 2003.
- Cremer T, Cremer C: *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells.* NAT. Rev. Genet **2**: 292-301, 2001.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bikmore WA: *Difference in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus.* J Cell Biol **145**: 1119-1131, 1999.
- D’Amato L, Di Porzio U: *Introduzione alla Neurobiologia.* Springer 2011.
- D’Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS: *Vitamin A metabolism: an update.* Nutrients **3**: 63-103, 2011.
- D'Alessio A, Vita GD, Cali G, Nitsch L, Fusco A, Vecchio G, Santelli G, Santoro M, Franciscis V. *Expression of the RET Oncogene Induces Differentiation of SK-N-BE Neuroblastoma Cells.* Cell Growth & Differentiation **6**: 1387-1394, 1995.

-
- Döhner H, Estey EH, Amadori S et al.: *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net*. Blood **115**(3): 453-474, 2010.
 - Emanuelsson I, Norlin M: Protective effects of 27- and 24-hydroxycholesterol against staurosporine-induced cell death in undifferentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells. Neuroscience Letters **525**: 44– 48, 2012.
 - Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff R: *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nature Genet. **13**: 399–408, 1996.
 - Federico C, Andreozzi L, Saccone S, Bernardi G: *Gene density in the Giemsa bands of human chromosomes*. Chromosome Res **8**: 737-746, 2000.
 - Federico C, Cantarella CD, Di Mare P, Tosi S, Saccone S: *The radial arrangement of the human chromosome 7 in the lymphocyte cell nucleus is associated with chromosomal band gene density*. Chromosoma **117**(4): 399-410, 2008.
 - Federico C, Scavo C, Cantarella CD, Motta S, Saccone S, Bernardi G: *Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates*. Chromosoma **115**(2): 123-8, 2006.
 - Ferrier DEK, Brooke NM, Panopoulou G, Holland PWH: *The Mnx homeobox gene class defines by HB9, MNR2 and amphioxus AmphiMnx*. Dev Genes Evol **211**: 103–107, 2001.
 - Frassetto LJ, Schlieve CR, Lieven CJ, Utter AA, Jones MV, Agarwal N, Levin LA: *Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **47**: 427–438, 2006.
 - Gao Z, Kim G, Mackinnon AC, Flagg AE, Bassett B, Earley JU, Svensson EC: *Ets1 is required for proper migration and differentiation of the cardiac neural crest*. Development **137**: 1543-1551, 2010.
 - Garcia-Barceló M, Chi-Hang Lua V, Soa M, Miao X, Leona T, Yuanc Z, Ngana E, Ehsana T, Ho-yu Chunga P, Khongc P, Wonga K, Tama P: *MNX1 (HLXB9) mutations in Currarino patients*. Journal of Pediatric Surgery **44**: 1892–1898, 2009.

-
- Gherardi S, Valli E, Erriquez D, Perini G. *MYCN mediated transcriptional repression in neuroblastoma: the other side of the coin*. *Frontiers in oncology* **3**, article 42, 2013.
 - Grasselli G, Strata P: *Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43*. *Front Neural Circuits* vol **7**, 2013.
 - Grasser F, Neusser M, Fiegler H, Thormeyer T, Cremer M, Carter NP, Cremer T, Muller S. *Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei*. *Journal of Cell Science* **121**: 1876-1886, 2008.
 - Hagan DM, Ross AJ, Strachan T, Lynch SA, Ruiz-Perez V, Wang YM, Scambler P, Custard E, Reardon W, Hassan S, Muenke M, et al.: *Mutation Analysis and Embryonic Expression of the HLXB9 Currarino Syndrome Gene*. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1504–1515, 2000.
 - Hatzi E , Murphy C, Zoephel A, Ras- mussen H, Morbidelli L, Ahorn H, et al.: *N-myc oncogene over expression down-regulates IL-6; evidence that IL-6 inhibits angiogenesis and suppresses neuroblastoma tumor growth*. *Oncogene* **21**: 3552– 3561, 2002.
 - Hayat MA: *Neuroblastoma*. Springer, 2012.
 - Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. *Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules*. *J Cell Biol* **107**: 1449-1459, 1988.
 - Holzer M, Craxton M, Jakes R, Arendt T, Goedert M: *Tau gene (MAPT) sequence variation among primates*. *Gene* **341**: 313-22, 2004.
 - Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM: *Caspase- 14 is a novel developmentally regulated protease*. *J Biol Chem* **273**:29648–53, 1998.
 - International Molecular Genetic Study of Autism Consortium: *A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q*. *Human Molecular Genet* **3**:571-578, 1998.
 - Iraci N, Diolaiti D, Papa A, Porro A, Valli E, Gherardi S et al.: *ASP1/MIZ1/MYCN repression complex recruits HDAC1 at the TRKA and p75NTR promoters and affects neuroblastoma malignancy by inhibiting the cell response to NGF*. *Cancer Res.* **71**: 404–412, 2011.

-
- Jiang J and Dingledine R: *Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection*. Trends in Pharmacological Sciences **34**(7), 2013.
 - Johnson E, Cotter FE: *Monosomy 7 and 7q-associated with myeloid malignancy*. Blood Reviews **1**: 46-55, 1997.
 - Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J: *Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response*. Cell Death Differ **9**: 1115–25, 2002.
 - Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, Misteli T: *Spatial genome organization during T-cell differentiation*. Cytogenet. Genome Res. **105**: 292–301, 2004.
 - Koenig U, Eckhart L, Tschachler E: *Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene*. Biochem Biophys Res Commun **285**: 1150–4, 2001.
 - Kolomietz E, Meyn M, Pandita A, Squire JA: *The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors*. Genes Chromosomes Cancer **35**: 97–112, 2002.
 - Kosak, ST, Skok JA, Medina KL, Riblet R, Le Beau MM, Fisher AG, Singh H: *Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development*. Science **296**: 158–162, 2002.
 - Kosik KS, Orecchio LD, Bruns GA, Benowitz LI, MacDonald GP, Cox DR, Neve RL. *Human GAP-43: its deduced amino acid sequence and chromosomal localization in mouse and human*. Neuron **1**(2): 127-32, 1988.
 - Kuroda M, Tanabe H, Yoshida K, Oikawa K, Saito A, Kiyuna T, Mizusawa H, Mukai K: *Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation*. Journal of Cell Science **117**: 5897-5903, 2004.
 - Lawen A: *Apoptosis - an introduction*. Bioessays **25**(9): 888-96, 2003.
 - Leist M and Jaattela M. *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**(8): 589-98, 2001.
 - Lever E and Sheer D: *The role of nuclear organization in cancer*. J Pathol **220**: 114–125, 2010.

-
- Li G, Gleinich A, Lau H, Zimmermann M: *Staurosporine-induced apoptosis presents with unexpected cholinergic effects in a differentiated neuroblastoma cell line*. *Neurochemistry International* **61**(7): 1011-20, 2012.
 - Mao YS, Zhang B, Spector DL: *Biogenesis and function of nuclear bodies*. *Trend Genet* **27**: 295-306, 2011b.
 - Matsumoto K, Wada R, Yamashiro J, Kaplan D, Thiele C: *Expression of brain-derived growth factor and p145 TrkB affects survival, differentiation and invasiveness of human neuroblastoma cells*. *Cancer Res.* **55**: 1798-1806, 1995.
 - Mishra R, Gupta S K, Meiri K F, Fong M, Thostrup P, Juncker D, Mani S: *GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons*. *Cell Cycle* **7**: 348–357, 2008.
 - Muller S, Finelli P, Neusser M, Wienberg J: *The evolutionary history of human chromosome 7*. *Genomics* **84**: 458-467, 2004.
 - Muller S, Stanyon R, O'Brian PC, Ferguson-Smith MA, Plesker R, Wienberg J: *Defining the ancestral karyotype of all Primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans*. *Chromosoma* **108**: 393-400, 1999.
 - Mungall A, Palmer S, Sims S, Edwards C, Ashurst J, Wilming L, Jones M, Horton R, et al. *The DNA sequence and analysis of human chromosome 6*. *Nature* Vol **425**, 2003.
 - Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Miklos GL, Wides R, Halpern A, Li PW, Sutton GG, Nadeau J, Salzberg SL, Holt RA, Kodira CD, Lu F, Chen L, Deng Z, Evangelista CC, Gan W, Heiman TJ, Li J, Li Z, Merkulov GV, Milshina NV, Naik AK, Qi R, Shue BC, Wang A, Wang J, Wang X et al. *A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome*. *Science* **296**(5573): 1661-71, 2002.
 - Nagel S, Scherr M, Quentmeier H, Kaufmann M, Zaborski M, Drexler HG, MacLeod RAF: *HLXB9 activates IL6 in Hodgkin lymphoma cell lines and is regulated by PI3K signaling involving E2F3*. *Leukemia* **19**: 841–846, 2005.
 - Nagel S, Kaufmann M, Scherr M, Drexler H.G., MacLeod R: *Activation of HLXB9 by juxtaposition with MYB via formation of t(6;7)(q23;q36) in an AML-M4 Cell Line (GDM-1)*. *Genes, Chromosomes & Cancer* **42**: 170–178, 2005.

-
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J: *Caspase-12 mediates endoplasmicreticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature **403**: 98–103, 2000.
 - Nakano T, Windrem M, Zappavigna V, Goldman SA: *Identification of a conserved 125 base-pair Hb9 enhancer that specifies gene expression to spinal motor neurons*. Dev Biol. **283**(2): 474-85, 2005.
 - Ness SA: *The MYB oncoprotein: regulating a regulator*. Biochim Biophys Acta **1288**: F123-139, 1996.
 - Nickerson E and Nelson DL: *Molecular definition of pericentric inversion brealpoints occurring during the evolution of human and chimpanzees*. Genomics **50**(3): 368–372, 1998.
 - Nix DA, Fradelizi J, Bockholt S, Menichi B, Louvard D, Friederich E, Beckerle MC: *Targeting of Zyxin to Sites of Actin Membrane Interaction and to the Nucleus*. The Journal Of Biological Chemistry **276**(37): 34759–34767, 2001.
 - Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L: *Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease*. Proc. Nat. Acad. Sci. **100**: 9548-9553, 2003.
 - Park J, Kim M, Lim J, Kim Y, Han K, Lee J, Chung NG, Cho B, Kim HK: *Three-way complex translocations in infant acute myeloid leukemia with t(7;12)(q36;p13): the incidence and correlation of a HLXB9 overexpression*. Cancer Genet Cytogenet. **191**(2): 102-5, 2009.
 - Patel NS, Rhinn M, Semprich CI, Halley PA, Dolle P, Bickmore WA, Storey KG: *FGF signalling regulates chromatin organisation during neural differentiation via mechanisms that can be uncoupled from transcription*. PLoS Genet. **9**(7), 2013.
 - Perelman P, Johnson W, Roos C, Seuànez H, Horvath J, Moreira M, Kessing B, Pontius J., Roelke M, Rumpler Y, Schneider M, Silva A, O'Brien S, Pecon-Slattery J. *A Molecular Phylogeny of Living Primates*. PLoS Genet **7**(3), 2011.
 - Ragoczy T, Bender MA, Telling A, Byron R, Groudine M: *The locus control region is required for association of the murine β -globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation*. Genes & Dev. **20**: 1447–1457, 2006.

-
- Rasouly D, Rahamm E, Ringel I, Ginzburg I, Muarakata C, Matsuda Y, Lazarovici P: *Neurites induced by Staurosporine in PC12 cells are resistant to Coichicine and express high levels of Tau proteins*. *Molecular Pharmacology* **45**: 29-35, 1993.
 - Rastogi RP, Richa, Rajeshwar P, Sinha RP: *Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity*. *EXCLI Journal* **8**: 155-181, 2009.
 - Rhinn M, Schuhbaur B, Niederreither K, Dollé P: *Involvement of retinol dehydrogenase 10 in embryonic patterning and rescue of its loss of function by maternal retinaldehyde treatment*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 16687-16692, 2011.
 - Rhinn M, Dollé P: *Retinoic acid signalling during development*. *Development* **139**(5): 843-58, 2012.
 - Richard F, Lombard M, Dutrillaux B: *Phylogenetic origin of human chromosomes 7, 16 and 19 and their homologs in placental mammals*. *Genome Res.* **10**: 644-651, 2000.
 - Rosati P: *Embriologia generale dell'uomo*. Edi-ermes, 2000.
 - Rynearson AL and Sussman CR: *Nuclear structure, Organization and oncogenesis*. *J Gastrointest Canc.* **42**(2): 112-7, 2011.
 - Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G: *The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4913-4917, 1992.
 - Saccone S, Federico C, Bernardi G: *Localization of the gene-richest and gene-poorest isocore in the interphase nuclei of mammals and bird*. *Gene* **300**: 169-178, 2002.
 - Salvesen GS and Renatus M: *Apoptosome: the seven-spoked death machine*. *Dev Cell* **2**(3): 256-7, 2002b.
 - Scherer S, Cheung J, MacDonald J, Osborne L, Nakabayashi K, Herbrick J, Carson A, Parker-Katirae L, et al. *Human Chromosome 7: DNA Sequence and Biology*. Science, 2003.
 - Schleiermacher S, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Klijanienko J, Couturier J, Pierron G, Mosseri V, Valent A, Auger N, Plantaz D, Rubie H, Valteau-Couanet D, Bourdeaut F, Combaret V, Bergeron C, Michon J, Delattre O: *Accumulation of*

Segmental Alterations Determines Progression in Neuroblastoma. J Clin Oncol **28**: 3122-3130, 2010.

- Schultheiss M, Schnichels S, Miteva K, Warstat K, Szurman P, Spitzer M, Van Linthout S: *Staurosporine-induced differentiation of the RGC-5 cell line leads to apoptosis and cell death at the lowest differentiating concentration*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **250**: 1221–1229, 2012.
- Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB: *Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families*. Am J Hum Genet **72**(1): 185-90, 2003.
- Seuànez HN: *The Phylogeny of human chromosomes*. Springer, 1979.
- Shaw P and Brown J. *Nucleoli: composition, function and dynamics*. Plant Physiol **158**: 44-51, 2012.
- Skok JA, Brown KE, Azuara V, Caparros ML, Baxter J, Takacs K, Dillon N, Gray D, Perry RP, Merckenschlager M, Fisher AG: *Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes*. Nat Immunol. **2**: 848–854, 2001
- Sridhar S, Al-Moallem B, Kamal H, Terrile M, Stallings RL: *New Insights into the Genetics of Neuroblastoma: Implications for Diagnosis and Therapy*. Mol Diagn Ther, 2013.
- Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J: *Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas*. Oncogene **26**(53): 7401-13, 2007.
- Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J: *Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas*. Oncogene **26**: 7401–7413, 2007.
- Takizawa T, Gudla PR, Guo L, Lockett S, Misteli T. *Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP*. GENES & DEVELOPMENT **22**: 489–498, 2008.
- Tanabe H, Muller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, Cremer M, Solovei I, Cremer C, Cremer T. *Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates*. Proc Natl Acad Sci **99**: 4424–4429, 2002.

-
- Tang XH, Gudas LJ. *Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer*. *Annu. Rev. Pathol.* **6**: 345-364, 2011.
 - Teunissen CE, Dijkstra CD, Jasperse B, Barkhof F, Vanderstichele H, Vanmechelen E, et al. *Growth-associated protein 43 in lesions and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis*. *Neuropathol. App. Neurobiol.* **32**: 318–331, 2006.
 - Thompson AF, Levin LA: *Neuronal differentiation by analogs of staurosporine*. *Neurochemistry International* **56**: 554–560, 2010.
 - Thurston VC, Zinkowski R, Binder LI: *Tau as a nucleolar protein in human non neural cell in vitro and in vivo*. *Chromosoma* **105**: 20-30, 1996.
 - Tosi S, Harbott J, Haas OA, Douglas A, Hughes DM, Ross FM, Biondi A, Scherer SW, Kearney L: *Classification of deletion and identification of cryptic translocations involving 7q by fluorescence in situ hybridization (FISH)*. *Leukemia* **10**: 644-649, 1996.
 - Tosi S, Scherer SW, Giudici G, Czepulkowski B, Biondi A, Kearney L: *Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders*. *Genes, Chromosomes & Cancer* **25**: 384-392, 1999.
 - Tura S: *Lezioni di ematologia*. Editore Esculapio, 2003.
 - Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson ADJ, Lunec J: *Evidence for the Development of p53 Mutations after Cytotoxic Therapy in a Neuroblastoma Cell Line*. *Cancer Research* **61**: 8–13, 2001.
 - Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson ADJ, Lunec J: *Evidence for the Development of p53 Mutations after Cytotoxic Therapy in a Neuroblastoma Cell Line*. *Cancer Res* **61**: 8-13, 2001.
 - Van Cruchten S, Van Den Broeck W: *Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. *Anat Histol Embryol* **31**(4): 214-23, 2002.
 - Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood* **114**: 937-951, 2009.
 - Vardiman JW: *The World Health Organization (WHO) classification of tumor of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasm*. *Chemico-Biological interaction* **184**: 16-20, 2010.

-
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C et al. *The sequence of the human genome*. Science **291**(5507): 1304-51, 2001.
 - Ventruto V, Sacco G, Lonardo F: *Testo-Atlante di Citogenetica Umana*. Springer, 2001.
 - Veschi V, Petroni M, Cardinali B, Dominici C, Screpanti I, Frati L et al. *Galectin-3 impairment of MYCN-dependent apoptosis-sensitive phenotype is antagonized by nutlin-3 in neuroblastoma cells*. PLoS ONE **7**(11), 2012.
 - Von Bergh AR, Van Drunen E, Van Wering ER, Van Zutven LJ, Hainmann I, Lönnerholm G, Meijerink JP, Pieters R, Beverloo HB: *High incidence of t(7;12)(q36;p13) in infant AML but not in infant ALL, with a dismal outcome and ectopic expression of HLXB9*. Genes Chromosomes Cancer **45**(8): 731, 2006.
 - Wang D, DuBois RN: *Prostaglandins and cancer*. Gut **55**: 115–122, 2006.
 - Waugh DJ and Catherine Wilson: *The Interleukin-8 Pathway in Cancer*. Clin Cancer Res **14**(21), 2008.
 - White JC, Highland M, Kaiser M, Clagett-Dame M. *Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo*. Dev. Biol. **220**: 263-284, 2000.
 - Wildenhain S, Ingenhag D, Ruckert C, Degistirici O, Dugas M, Meisel R, Hauer J, Borkhardt A. *Homeobox protein HB9 binds to the prostandindin E receptor 2 promoter and inhibits intracellular cAMP mobilization in leukemic cells*. J Biol Chem, 2012.
 - Wilkens L, Flemming P, Gebel M, Bleck J, Terkamp C, Kreipe H, Schlegelberger B. *Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma*. Proc Natl Acad Sci USA **101**: 1309-1314, 2004.

-
- Wilkens L, Jaggi R, Hammer C, Inderbitzin D, Giger O, Von Neuhoff N. *The homeobox gene HLXB9 is upregulated in a morphological subset of poorly differentiated hepatocellular carcinoma*. Virchows Archive Springer **458**: 697–708, 2011.
 - Williams RR, Azuara V, Perry P, Sauer S, Dvorkina M, Jorgensen H, Roix J, McQueen P, Misteli T, Merckenschlager M, Fisher AG. *Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus*. J Cell Sci. **119**(Pt 1): 132-40, 2006.
 - Xie H, Hu L, Li G. *SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Chinese Medical Journal **123**(8): 1086-1092, 2010.
 - Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. *Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing*. Cell Transplant **19**(6): 667-79, 2010.
 - Yasuhiro Deguchi and John H. Kehrl. *Selective Expression of Two Homeobox Genes in CD34-Positive Cells From Human Bone Marrow*. Blood **78**(2): 323-328, 1991.
 - Yunis J and Prakash O. *The origin of man: a chromosomal pictorial legacy*. Science **208**: 1145-1148, 1982.

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso desidero ringraziare il Prof. Salvatore Saccone che mi ha seguita in questi tre anni e mi ha aiutata nello sviluppo dello studio oggetto della presente tesi; le sue intuizioni e le sue idee sono state preziose ed essenziali per avanzare nel lavoro di ricerca effettuato.

Un grazie va alla Prof.ssa Concetta Federico per avermi spronata a “camminare con le mie gambe”. È riuscita a rendermi indipendente ma nonostante ciò non mi ha mai fatto mancare il suo sostegno ed i suoi consigli sono stati sempre utili e talvolta risolutivi.

Ringrazio la Dott.ssa Sabrina Tosi per avermi ospitato, durante il primo anno di dottorato, a Londra, nel suo laboratorio alla Brunel University. Il suo sorriso e la sua cordialità mi hanno fatto sentire a casa. La ringrazio perché, anche a distanza, mi ha supportato e aiutato professionalmente in questi anni.

Infine, durante i tre anni trascorsi ho avuto modo di conoscere e di apprezzare alcuni docenti che si sono distinti per gentilezza e disponibilità, fra questi la Prof.ssa Violetta Brundo, il Prof. Salvatore Motta e la Prof.ssa Laura Gil.