

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI



SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE

Indirizzo: Biochimica e Biologia Molecolare
XXIV CICLO

Coordinatore Prof. Bruno Masala

ASPETTI DELLA SENESCENZA IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: DALLE MODIFICHE CROMATINICHE AL BLOCCO DEL CICLO CELLULARE.

Coordinatore

Ch.mo Prof.
Bruno Masala

Tutor

Ch.mo Prof.
Luigi Marco Bagella

Dottorando

Dott. Nicola Alessio

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

A CARLO ALESSIO

*CHE POTRÀ NON CAPIRE MAI DI CROMATINA, CICLO CELLULARE E SENESCENZA
EPPURE MI HA INSEGNATO SULLA VITA PIÙ DI QUANTO PROBABILMENTE SAPRÀ MAI*

GRAZIE PAPÀ

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

INDICE

Ringraziamenti

1. Introduzione	1
1.1 L'invecchiamento	2
1.1.1 Perché invecchiamo?	2
1.2 Cellule Staminali	3
1.2.1 Le cellule staminali mesenchimali	4
1.2.2 MSC in campo clinico	5
1.3 La senescenza replicativa	7
1.3.1 dall'invecchiamento alla senescenza	7
1.3.2 Il controllo della senescenza	8
1.3.3 Connessione tra senescenza ed invecchiamento	10
1.3.4 La senescenza nelle MSC	13
1.4 "FOCUS ON ":	16
1.4.1 Modifiche cromatiniche	16
1.4.2 Modifiche nella proliferazione	20
1.5 Interazione tra RB family ed i complessi SWI/SNF	27
1.5.1 I rispettivi ruoli di BRM, BRG1 ed RB	28
2. Scopo del Lavoro	30
3. Materiali e Metodi	33
3.1 Colture di MSC	34
3.2 Produzione di adenovirus	35
3.2.1 Espansione di adenovirus <i>in vitro</i>	35
3.2.2 Determinazione del titolo adenovirale	35
3.2.3 Trasduzione delle MSC	36
3.3 Trasduzione con vettori Lentivirali	37
3.4 Analisi del Ciclo Cellulare	38
3.5 Saggio dell'annessina V	38
3.6 Saggio della valutazione della caspasi 9	38
3.7 Saggio della β -galattosidasi	39
3.7.1 Saggio nel visibile	39
3.7.2 Saggio in fluorescenza	39
3.8 Saggio TRAP	40
3.8.1 Preparazione del gel di poliacrilammide	40
3.9 Saggio d'immunocitochimica per la rivelazione di HP1	41
3.10 Saggio della nucleasi Micrococcica	42
3.11 saggio di proliferazione cellulare mediante incorporazione di BrdU	43
3.12 Saggio Unità Formanti Colonie (CFU)	43
3.13 Il trattamento con agenti che danneggiano il DNA	44
3.14 Saggio d'immunocitochimica per la rilevazione dell'8-oxodG	44
3.15 Saggio d'immunocitochimica per la rilevazione di H2A.X	45
3.16 Saggio per la valutazione delle capacità di riparo	46
3.17 Comet Assay	46
3.18 Terreni per l'induzione adipo-, osteo- ed condrogenica	47
3.18.1 Differenziamento Adipogenico	48
3.18.2 Differenziamento Osteogenico	48
3.18.3 Differenziamento Condrogenico	49
3.19 Estrazione dell'RNA dalle cellule	49
3.20 analisi dell'mRNA mediante RT-PCR semiquantitativa	50
3.21 Preparazione del gel di agarosio	54
3.22 Lisati cellulari per estrazione di proteine	54

Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

3.23 Western blot	55
3.23.1 Preparazione di mini-gel di poliacrilammide denaturanti	55
3.23.2 Trasferimento su filtro	56
3.23.3 Ibridazione del filtro	56
3.23.4 Rivelazione dell'anticorpo	56
3.24 Analisi Statistiche	57
4. Risultati	58
4.1 BRG1	59
4.1.1 KnockDown di BRG1	59
4.1.2 Il silenziamento di BRG1 non mostra alcun effetto sulla progressione del ciclo cellulare mentre riduce l'apoptosi	59
4.1.3 Il silenziamento di BRG1 promuove la senescenza ed ha effetti sulle proprietà staminali delle MSC	59
4.1.4 La senescenza è associata con cambi nello stato cromatinico	63
4.1.5 La senescenza potrebbe associarsi con danni al DNA	64
4.1.6 RB e P53 crosstalk	67
4.2 RB Family	71
4.2.1 Il silenziamento dei membri della famiglia del Retinoblastoma	71
4.2.2 Effetti sulla crescita cellulare	71
4.2.3 Effetti opposti sulla senescenza ed apoptosi	74
4.2.4 RB family e danni al DNA	74
4.2.5 Meccanismi molecolari associati con il silenziamento delle proteine del retinoblastoma	79
4.2.6 Il silenziamento dei geni del RB family ha effetto sulle proprietà staminali delle MSC	80
4.2.7 Effetti del silenziamento di RB2/P130 a lungo termine	83
5. Discussione e Conclusioni	87
5.1 Effetti del silenziamento di BRG1	89
5.1.2 I pathways di RB e di P53 sono coinvolti negli effetti biologici osservati	89
5.2 Effetti del silenziamento dei geni del Retinoblastoma	91
5.2.1 Il silenziamento di RB induce danni al DNA ed uno stato senescente	92
5.2.2 Il silenziamento di RB2/P130 riduce lo stato apoptico e senescente nelle MSC	93
5.2.3 Gli SAHF e la senescenza nelle MSC silenziate di RB, RB2/P130 e P107	94
5.2.4 Le MSC silenziate di RB, RB2/P130 e P107 mostrano il processo differenziativo compromesso	95
5.2.5 La mancanza di RB e di RB2/P130 sembra indirizzare le cellule verso un fenotipo adipocitario	95
5.2.6 Chi fa cosa?	96
5.3 Conclusioni	98
7. Bibliografia	

RINGRAZIAMENTI

*Quando sarò vecchio punto e basta
la vita che finisce mostrerà il suo culo
Con la mia pensione "che non vedrò"
si sarà consumato tutto il mio futuro
Darò del cretino a chi mi pare
dirò che tutti i libri non servono a niente
E che mille secoli di storia
non valgono un secondo vissuto veramente
con chi ha combattuto per restare vivo
con chi mi ha aiutato mentre mi arrangiavo
con chi mi ha insegnato qualche cosa che
risplende dentro di me*

*...Se non sarò in grado quando è ora
mi va di farlo adesso che sono cosciente
prima che durezza ci separi
ringrazio tutti quanti, infinitamente...
(Jovanotti, Quando sarò vecchio)*

...non pensavo che fosse così difficile scrivere dei ringraziamenti, un po' perché molte persone hanno contribuito a formare la persona che oggi sono ed è impossibile elencarli tutti, ed un po' perché nonostante la gioia di arrivare ad un traguardo così importante, si ha sempre paura di perdere qualcosa.

Spero di essere stato all'altezza di quanto mi è stato chiesto di fare, di certo l'impegno e la passione da parte mia non sono mancati. In ogni caso ho cercato di puntare al massimo in tutte le circostanze.

Molte sono le cose che avrei voluto approfondire, ma si sa prima o poi bisogna pur finire per iniziare un dopo, ed io l'ho vista soprattutto come una mia manifestazione personale per il dopo, per quello che mi piacerebbe fare in seguito, insomma come un'introduzione al mio futuro.

Ringrazio innanzitutto i miei due relatori: il Prof. Umberto Galderisi, che ha inseguito il medesimo sogno prima di me e ha lasciato alcuni segnali che hanno reso più facile il mio percorso: punti dove fissare la corda, sentieri che abbreviano il tragitto, rami spezzati che consentono una marcia più spedita. Il cammino appartiene a me, al pari di ogni responsabilità, ma la sua esperienza è stata di grande aiuto; il Prof. Luigi Marco Bagella per la sua semplicità e disponibilità e per essere sempre presente in ogni circostanza che mi ha accompagnato in questi tre anni burrascosi.

Un ringraziamento profondo va alle Dottoresse Fulvia Zanichelli e Stefania Capasso (Fulvia potrebbe "incazzarsi" se la metto dopo Stefania, quindi non ho seguito un ordine alfabetico del nome) per aver condiviso tutto in questi tre anni passati assieme, dalle gioie quotidiane ai sotterfugi per i piccoli problemi. Vorrei ricordare solo una cosa; è meglio le cose farle subito e non domani o perché non dopodomani ;).

Non posso non ringraziare la Prof.ssa Marilena Cipollaro, il Dott. Giovanni Di Bernardo e la Dott.ssa Amalia Forte che in maniera diversa hanno contribuito alla mia formazione professionale.

Un doveroso ringraziamento va invece ai miei colleghi "Napoletani": Tiziana Squillaro, Alessandra Cirillo, Mario Grossi, Mauro Finicelli, Stefania Del Gaudio.

Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

Pur stimolati da un preciso obiettivo nella mente – “raggiungere la vetta” -, durante la salita si possono ammirare altre persone: non è costato nulla fare alcune soste e godermi le persone vicine, le quali mi hanno aiutato a guardare “l’essenziale oltre l’invisibile”.

Un ringraziamento va ai miei colleghi “Sardi”: Irene Marchesi, Vittorio d’Urso (perché sì!!! oramai è “Sardo”, anche se con l’accento non si è impegnato poi così tanto), Elena Mura e Gianni Contini, per l’ospitalità che non mi hanno mai fatto mancare (come fanno dei buoni padroni di casa), per essere sempre stati disponibili e per tutto l’aiuto anche nei piccoli problemi da laboratorio.

In fondo il laboratorio è un “porto di mare” ed i tesisti che in questi tre anni si sono avvicinati sono stati veramente molti, a tutti quelli che in maniera diversa hanno contribuito nel darmi una mano nella realizzazione di questo progetto: grazie. In modo particolare ringrazio due di loro: il Dott. Emanuele Esentato per avermi fatto scoprire le bellezze del mare; ed Angela Ferone per aver contribuito alla correzione di questa tesi.

Non posso certamente dimenticare le “new entry” del gruppo del prof Bagella, i dottorandi e non del gruppo della Prof.ssa Maioli, del Prof. Deiana e del Prof. Pintus: a tutti voi infinitamente grazie. Lo so ti aspetti qualche rigo solo per te un ringraziamento particolare va “Genfry” per essere stato più di una volta il mio “chauffeur”.

Mancano i ringraziamenti a quelle persone che di questa tesi ne capiranno poco o quasi nulla ma che nella vita al di là del laboratorio sono state particolarmente importanti.

Un ringraziamento particolare va a mia madre, che non mi ha fatto mancare mai nulla, mai, e non solo dal punto di vista materiale. Ha riposto in me tutte le sue aspettative, e spero di non averla delusa neanche per un secondo. Insieme a mamma un grazie va a tutta la mia famiglia ed ad Angela in particolare che più che una nipote è sempre stata una sorella.

I miei amici non possono certamente mancare dopotutto sono stati loro a sopportarmi tutte le volte che scleravo su RB ed RB2 cercando di fargli capire come funziona “la vita”. Un grazie a Guido (o Alessio come vi pare), Claudio, Antonello, Alfonso, Mary, Michela e Peppe.

Un ringraziamento particolare va a Marco perché più di tutti mi ha sopportato.

1.INTRODUZIONE

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

1.1 L'invvecchiamento

Sin dagli albori della sua esistenza l'uomo è stato incuriosito e suggestionato dal mistero della vita, l'idea di poter plasmare un uomo o un essere vivente in vitro, di raggiungere l'immortalità, o meglio, l'eterna giovinezza è sempre stata un "sogno" ambito da molti. L'aspirazione dell'uomo a essere indenne dalle sofferenze e dai dolori provocati dalle malattie e il desiderio di sconfiggere l'inevitabile "malattia", la morte, sono convogliati nella ricerca di possibili rimedi.

La morte naturale è il fenomeno che conclude un ciclo vitale geneticamente determinato e sancisce l'ineluttabile punto di arrivo dell'invvecchiamento "fisiologico". L'invvecchiamento d'altro canto può essere considerato, come il progressivo deterioramento delle capacità omeostatiche e d'adattamento all'ambiente in funzione di un solo fattore, quello cronologico. Per tale motivo l'invvecchiamento "fisiologico", o normale, può essere detto anche "mono fattoriale", poiché comprende il complesso di modificazioni morfologiche e funzionali, di tipo involutivo, che intervengono nell'individuo adulto per opera della sola azione del fattore tempo, che indica l'avanzamento dell'individuo nella sua età cronologica.

L'invvecchiamento è, in generale, il processo naturale che conduce a un aumento dell'entropia in un qualunque sistema fisico. Gli oggetti inorganici subiscono passivamente tale processo, mentre, gli esseri viventi sono dotati di sistemi, che consentono loro di contrastarne l'azione, ovvero di mantenere costante l'ordine della propria struttura fisica. Nonostante ciò per la maggior parte degli organismi (in genere i pluricellulari complessi) l'invvecchiamento è una fase inevitabile del loro percorso di sviluppo biologico, poiché in esso sono implicati vari meccanismi fisici e biologici.

Il processo, che risulta essere irreversibile e comporta modificazioni biologiche, morfologiche e psicologiche è inoltre caratterizzato da una riduzione delle abilità psicofisiche e da una progressiva involuzione morfologica e strutturale.

1.1.1 Perché invvecchiamo?

Quali siano le cause scatenanti dell'invvecchiamento, non sono state ancora dimostrate con chiarezza; in generale, sono state formulate due teorie per spiegare il fenomeno:

- Teoria dell'invvecchiamento programmato;
- Teoria dell'invvecchiamento casuale.

La prima teoria afferma, che esisterebbero dei geni regolatori che causerebbero, secondo uno schema predeterminato, i cambiamenti caratteristici dell'età senile (Jeyapalan, Sedivy, 2008).

La seconda teoria enuncia, che l'invecchiamento sarebbe il prodotto di una serie di modificazioni peggiorative, che aumentano col passare del tempo e determinate in modo casuale (d'Adda di Fagagna et al., 2003).

Un'altra teoria dell'invecchiamento casuale sostiene, che una serie d'errori combinati quali mutazioni nel materiale genetico (a seguito d'alterazioni delle reazioni enzimatiche, che intervengono nella replicazione del DNA), provocherebbero un danno irreversibile al DNA, con conseguente modificazione delle caratteristiche biologiche della cellula (Grossman, 2005).

Il processo è accelerato dall'ambiente in cui il soggetto vive e da fattori comportamentali come l'obesità, il diabete, stadi terminali di malattie renali ed esposizioni a mutageni, come i chemioterapici, luce ultravioletta e fumo di sigarette.

Sebbene tutte queste osservazioni possano suggerire eventuali spiegazioni al fenomeno in termini molecolari, l'invecchiamento umano resta un enigma.

Negli ultimi anni grazie agli innumerevoli studi e in particolar modo alle scoperte delle cellule staminali, si è formulata l'ipotesi, che esse possono contribuire al nostro invecchiamento, in quanto l'arresto della loro funzione replicativa comporta il progressivo declino della rigenerazione e dell'omeostasi dei tessuti. (Sharpless, DePinho, 2007).

Si potrebbe supporre, che con l'età, c'è un calo generale nel numero delle cellule staminali e che alla fine muriamo perché restiamo a "corto" di cellule staminali. Tuttavia, questo ancora oggi, non è un dato certo (Jones, Rando).

Anche se diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare l'invecchiamento cellulare, quello maggiormente accreditato suggerisce che i danni al DNA portano all'attivazione di meccanismi di soppressore tumorali, come la senescenza, che limita la funzione delle cellule staminali con l'aumentare dell'età (Sharpless and DePinho, 2007).

1.2 Cellule Staminali

Le cellule staminali sono rese tali dalla presenza di due caratteristiche:

- l'abilità di differenziare in più tipi cellulari (multipotenzialità)
- l'abilità simultanea di mantenere inalterato il pool di staminali (self-renewal).

Nelle fasi iniziali dello sviluppo umano, le cellule staminali, situate nell'embrione, sono diverse da tutti i tipi di cellule esistenti nell'organismo, in quanto capaci di dare origine a tutti i tipi cellulari (differenziate e staminali adulte), che compongono un organismo adulto in un momento, in cui è fondamentale la plasticità somatica (Blau et al., 2001).

Il mantenimento della pluripotenzialità è confermato dalla presenza di fattori trascrizionali come OCT4 e NANOG e dall'alta mobilità del gruppo dei fattori trascrizionali SOX2. Nel 2006 Yamanaka et al. hanno dimostrato, che riesprimendo i geni

SOX2, OCT4, KLF4 e c-MYC in fibroblasti di topo, questi riassumevano le caratteristiche di pluripotenzialità (Yamanaka, Takahashi, 2006).

Le cellule staminali adulte, seppur indifferenziate, sono indirizzate verso una via di differenziamento e di rigenerazione dei soli tessuti in cui risiedono, in quanto sono coinvolte solo nella crescita dell'organismo e presiedono all'omeostasi e al riparo d'eventuali tessuti danneggiati (Preston et al., 2003).

La scoperta, che le cellule staminali adulte possano traslocare dal tessuto nel quale risiedono per raggiungere altri distretti e contribuire alla loro omeostasi, ha aperto la strada a una nuova visione delle cellule staminali non-embrionali (Blau et al., 2001, Prockop, 1997).

Fra tutti i tessuti soggetti a turnover, il sangue è quello che presenta un'emivita più breve e ciò ha indirizzato l'attenzione sulle cellule staminali che risiedono nel midollo osseo, in quanto forniscono per tutta la vita, gli elementi figurativi del sangue (cellule staminali ematopoietiche) (Prockop, 1997).

Inoltre, nel microambiente del midollo osseo è presente una seconda classe di cellule staminali, derivanti dal mesoderma, che hanno la capacità di dare origine a cellule non-ematopoietiche. Tale citotipo è definito "cellule staminali mesenchimali" (Prockop, 1997).

1.2.1 Le Cellule staminali mesenchimali

Friedenstein e Owen hanno riportato che dallo stroma del midollo osseo potevano generarsi cellule del tessuto osseo, cartilagineo e adiposo.

Questo ha suggerito l'esistenza di cellule staminali non-ematopoietiche (Uccelli et al., 2008).

In seguito, queste cellule dalla morfologia allungata, capaci di crescere su monostrato sono state isolate e denominate "*Clony Forming Unit fibroblasts (CFU-F)*".

In seguito Caplan ha dimostrato l'abilità dei CFU-F di proliferare in vitro, preservando la capacità di differenziare, pertanto sono stati denominati cellule staminali mesenchimali (MSC) (Coplan et al. 2008).

Originariamente le MSC derivano dal midollo osseo ma possono essere isolate anche da altri tessuti, come quello adiposo, muscolare, cartilagineo etc. (Lodi et al., 2011).

Al momento non presentano marcatori specifici capaci di identificarle in modo univoco. Tuttavia vi è un consenso generale circa quelli delle MSC umane, che risultano essere positive a CD73, CD90 e CD105, ma non quelli ematopoietici ed endoteliali CD45, CD34 e CD31 (Dominici et al., 2006).

Recentemente, è stato riportato, che le MSC possono anche differenziare in cellule di origine non-mesenchimali come astrociti, neuroni e oligodendrociti (Jori et al., 2005b).

Tale processo prende il nome di trans-differenziamento (Prockop, 1997) (Figura 1).

Diversi studi hanno dimostrato non solo il differenziamento delle MSC nei diversi tessuti, ma anche la loro funzione deputata al riparo di organi danneggiati e alla ricostituzione del sistema immunitario. Esse presentano inoltre la capacità di differenziare in cellule endoteliali, contribuendo alla rivascolarizzazione del tessuto ischemico.

Si è dimostrato, che in vitro le MSC secernano varie molecole bioattive (anti-apoptiche, immunomodulatorie, angiogeniche e chemio-attrattive), mentre in vivo interagiscono con le cellule del sistema immunitario innato ed adattivo, al fine di guidarne la modulazione (Lodi et al., 2011). La capacità delle MSC di assolvere principalmente queste ultime funzioni, ha aperto gli orizzonti sul loro possibile utilizzo in ambito clinico ed in particolar modo nel campo della medicina rigenerativa.

1.2.2 MSC in campo clinico

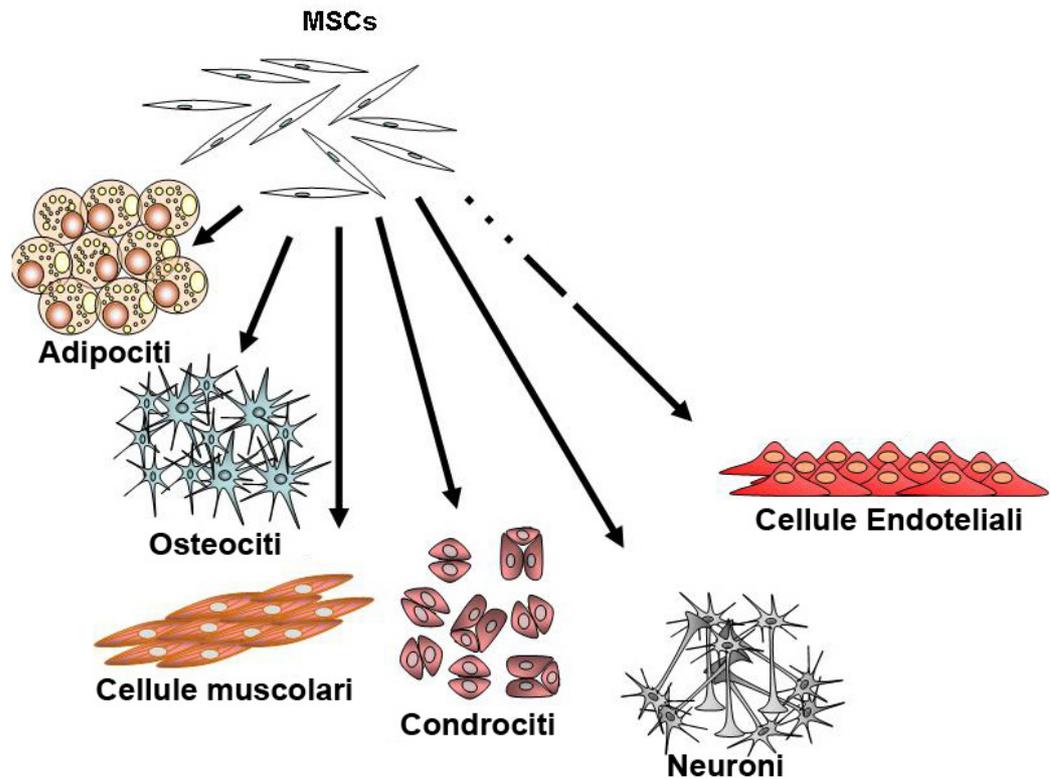
Le MSC sono state valorizzate in studi preclinici e clinici, divenendo un potenziale efficace nell'ambito della terapia cellulare per la rigenerazione e il riparo dei tessuti.

Studi condotti sull'uomo e sugli animali hanno dimostrato che l'applicazioni delle MSC risulta efficace nella cura di patologie come il diabete di tipo 1, il morbo di Crohn, il morbo di Parkinson ed ect. (Mimeault et al., 2007).

Affinché le cellule staminali possano trovare impiego nel campo terapeutico, è necessario che presentino alcune caratteristiche:

- essere isolabili da un distretto facilmente accessibile
- capacità di raggiungere il tessuto danneggiato (homing)
- essere di numero adeguato per esercitare la loro funzione

Figura 1



Plasticità somatica delle cellule staminali mesenchimali.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule con la capacità di autorinnovarsi e differenziarsi continuamente in cellule specializzate. Sono cellule di origine midollare, ma si ritrovano anche nel tessuto adiposo, nel sangue periferico, nel cordone ombelicale, etc. Presentano la capacità di dare origine a cellule mesodermali come osteociti, condrociti ed adipociti e non mesodermali come astrociti, neuroni ed oligodendrociti.

Le MSC sono particolarmente adatte all'uso terapeutico poiché sono facilmente isolate da un distretto accessibile, quale il midollo osseo, e presentano una spiccata attività

immunomodulatoria che le rende adatte al trapianto autologo ed eterologo. Per quanto concerne la capacità di raggiungere il tessuto danneggiato, solo una piccola parte è in grado di farlo, mentre la restante finisce nella fitta rete degli alveoli polmonari, dove esplicano la loro attività (Schrepfer et al., 2007). Infine, per l'esiguità del numero di cellule presenti in un aspirato midollare, è opportuno ricorrere all'amplificazione *in vitro*. Tale procedura correlata alla stabilità genetica delle MSC è efficiente per il loro incremento, ma al contempo inefficiente perché soggetta al fenomeno della senescenza replicativa.

1.3 La senescenza replicativa

Il termine senescenza deriva dal latino "senectus" ed è usato come sinonimo d'invecchiamento.

Esso indica il processo per cui durante la divisione cellulare alcune cellule perdono progressivamente la capacità di dividersi (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

1.3.1 Dall'invecchiamento alla senescenza

Lo studio dei fenomeni dell'invecchiamento a livello cellulare è più semplice rispetto alle ricerche epidemiologiche e cliniche, perché nel primo caso si possono tenere ben distinti i fattori relativi all'invecchiamento in sé e per sé da quelli provocati dalle malattie che spesso accompagnano l'età avanzata. I grandi lavori di ricerca sull'invecchiamento delle cellule sono stati eseguiti utilizzando fibroblasti provenienti dalla pelle umana, posti in coltura in particolari condizioni. I fibroblasti umani, i quali mostrano una limitata proliferazione *in vitro* prima di entrare stabilmente in arresto. La senescenza replicativa è stata osservata inoltre, anche nei linfociti T, negli osteoblasti e nelle cellule endoteliali umane, anche se in questi casi il fenotipo senescente è meno chiaro (Jansen-Durr, 2002). Il fenomeno della senescenza fu descritto per la prima volta 50 anni fa da Hayflick a Moorfield, come un processo, che limitava proprio la crescita dei fibroblasti umani (Hayflick, Moorhead, 1961).

La capacità proliferativa di queste cellule è divisa in tre fasi:

- la fase I, che corrisponde a un periodo di scarsa proliferazione;
- la fase II, che corrisponde invece a un periodo di elevata proliferazione
- la fase III, in cui le cellule riducono man mano la capacità proliferativa fino a bloccarsi completamente.

Il numero di divisioni cellulari, che una cellula normale compie prima di entrare in senescenza dipende dal citotipo, dall'età e dal background genetico (Campisi, 1997).

In genere le cellule senescenti, la cui crescita è arrestata irreversibilmente, mostra una morfologia larga e piatta e a livello biologico cambi nell'espressione genica e nell'organizzazione della cromatina (Funayama et al., 2006, Gonos et al., 1998, Xie et al., 2005). Le cellule senescenti mantengono un metabolismo attivo, che permette loro di essere vitali per lunghi periodi, conferendole un'elevata stabilità, dovuta alla capacità di resistere all'apoptosi (morte programmata della cellula) (Marcotte et al., 2004).

Le cellule senescenti sono in grado di secernere una vasta gamma di fattori, come enzimi degradativi, citochine infiammatorie e fattori di crescita, che stimolano l'invecchiamento e/o la tumorigenesi (Sethe et al., 2006).

1.3.2 Il controllo della senescenza

Esistono diversi meccanismi di senescenza in funzione dei differenti protocolli sperimentali utilizzati, delle differenti condizioni di crescita e delle diverse linee cellulari.

Concettualmente sono identificabili due tipi di meccanismi:

- senescenza innescata da accorciamento dei telomeri o da altre forme di danno genomico, che determinano un aumento della proteina P53 come soppressore tumorale (Herbig et al., 2004);
- senescenza innescata da up-regolazione di P16^{INK4a} (Inibitore di chinasi dipendente da ciclina attivata dall'up-regolazione di RB), che a sua volta può essere indotta da perturbazione allo stato cromatinico o da diverse cause di stress (Jeyapalan, Sedivy, 2008).

L'attivazione del *pathways* P21-P53 o/e del *pathway* RB-P16^{INK4a} è essenziale per l'induzione della senescenza in diverse varietà di cellule umane.

Questi *pathways* possono interferire con la progressione del ciclo cellulare o determinare in maniera indipendente un suo arresto.

- Il *pathway* P53

Stimoli generati da un DDR (dall'inglese DNA Damage Response) inducono un fenotipo senescente principalmente attraverso il *pathway* P53. Il *pathway* è regolato in molteplici punti da proteine come l'ubiquitina E3 e da HMDM2, i quali facilitano la degradazione di P53, e da ARF, la quale invece inibisce l'attività di HMDM2.

P21 è un target cruciale di P53 ed è un mediatore nella senescenza indotta da quest'ultima. Tuttavia P21 è anche un mediatore del DDR inducendo l'arresto cellulare transiente o l'apoptosi a seconda che il danno al DNA sia correttamente riparato o non riparabile perché di "grande entità".

Il DDR e il *pathway* di P53 forniscono in prima linea una difesa al cancro, impedendo la crescita cellulare se il DNA è gravemente danneggiato, che sono a rischio di sviluppare o diffondere mutazione oncogeniche (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

- Il *pathway* P16-RB

Gli stimoli che producono un DDR possono anche attivare il *pathway* P16-RB, ma questo avviene di solito in seguito al coinvolgimento del *pathway* P53. La senescenza induce stimoli che agiscono principalmente attraverso il *pathway* P16-RB. Questo è particolarmente vero per le cellule epiteliali, che sono, come i fibroblasti, più inclini a indurre un arresto della crescita con un aumento di P16. Inoltre, vi sono specie-specifiche differenze: per esempio, l'accorciamento dei telomeri attiva in primo luogo il *pathway* di P53 nelle cellule di topo, mentre nelle umane attiva sia il *pathway* P53 che P16-RB.

L'oncogene RAS induce l'espressione di P16 e attiva fattori di trascrizione come ETS; l'attività ETS è controbilanciata dalle proteine ID, che sono inibite nelle cellule senescenti. Al momento non è chiaro come le cause che inducono senescenza portano all'espressione di P16. Un meccanismo possibile è la ridotta espressione dei repressori Polycomb INK4a come BMI1 e CBX7. Coerentemente con questa idea, l'up-regolazione di BMI1 o CBX7 aumenta la durata della vita dei fibroblasti umani e di topo.

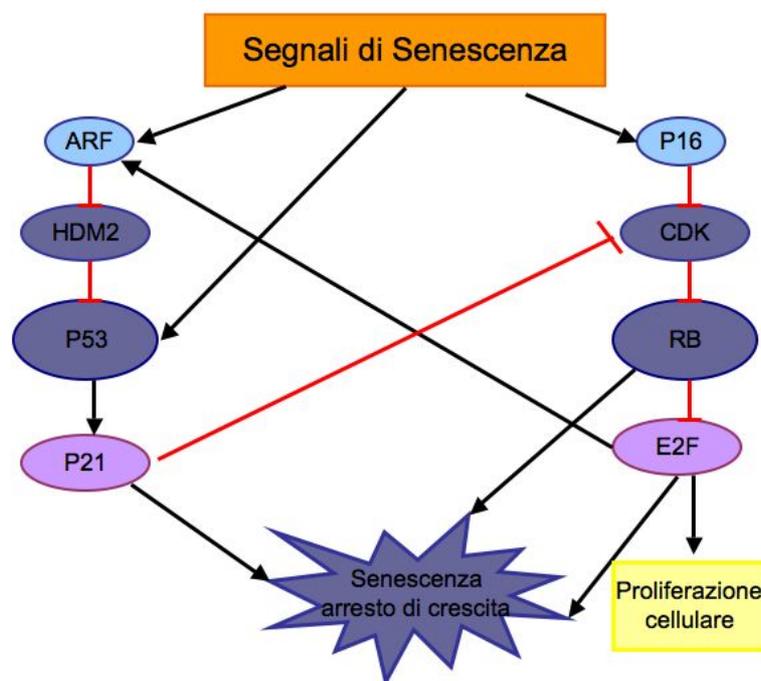
P16 e P21 sono entrambi CDKIs, di conseguenza, entrambi possono mantenere RB in uno stato attivo, ossia ipofosforilato, impedendo così al fattore trascrizionale E2F di attivare i geni necessari per la proliferazione. Tuttavia, P16 e P21 sono chiaramente non equivalenti. Le cellule senescenti per opera del *pathway* P53-P21 possono riprendere la crescita dopo l'inattivazione di P53 fino al raggiungimento di una catastrofe mitotica. Anche le cellule senescenti a causa dell'oncogene RAS (che induce l'espressione di P16) possono recuperare una limitata proliferazione, al contrario, le cellule che coinvolgono pienamente il *pathway* P16-RB, non sono, di solito, in grado di riprendere la crescita per diversi giorni anche dopo l'inattivazione di P53, P16 o RB. Inoltre, la perdita di P16-RB determina un aumento dell'attività di P53 e P21 in parte perché E2F stimola l'espressione di ARF. Nonostante la regolazione reciproca tra i *pathways* P53 e P16-RB (Figura 2), vi sono differenze nel modo in cui le cellule rispondono all'uno o all'altro *pathway* (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

1.3.3 Connessione tra senescenza e invecchiamento

Il legame tra la senescenza cellulare e l'invecchiamento è più incerto che tra la senescenza e il cancro. Come osservato in precedenza, il numero di cellule senescenti

aumenta con l'età, e le cellule senescenti sono presenti nei siti di patologie legate all'età. L'espressione di p16 aumenta con l'età nelle cellule staminali e nelle cellule progenitrici del cervello di topo, del midollo osseo e del pancreas, dove si sopprime la proliferazione delle cellule staminali e la rigenerazione dei tessuti. L'aumento di P16 nelle cellule staminali è evidente nei primi mesi d'età. Sorprendentemente, il regresso nella crescita delle cellule staminali e nella rigenerazione dei tessuti, in funzione dell'età, sono notevolmente ritardati nei topi geneticamente modificati per la mancanza di P16. Tuttavia, come è prevedibile, questi topi modificati muoiono prematuramente di cancro. L'incremento di P16 correlato con l'avanzare dell'età, nelle cellule staminali e nelle cellule progenitrici è coerente con l'idea che la senescenza delle cellule staminali potrebbe almeno in parte spiegare il regresso, in funzione dell'età di un individuo, dello sviluppo della funzione del cervello, del midollo osseo e del diabete di tipo II. Tuttavia, non è ancora noto se l'espressione di P16 nelle cellule staminali e in quelle progenitrici induca in realtà uno stato senescente. E' possibile quindi che sia l'attività onco-soppressiva di P16 a causare l'arresto della crescita senza induzione di senescenza. Tuttavia, questi risultati suggeriscono che la funzione tumore-soppressiva correlata con l'espressione di P16 può essere indissolubilmente legata al fenomeno pro-invecchiamento. Un simile compromesso tra soppressione del tumore e invecchiamento è stato osservato nei topi con elevata attività di P53; gli animali che esprimono elevati livelli di P53 non presentano tumore, ma mostrano segni precoci d'invecchiamento. Un secondo meccanismo con cui le cellule senescenti potrebbero contribuire all'invecchiamento deriva dal fatto che esse presentano un'espressione genica alterata dei geni che codificano per la matrice extracellulare, enzimi degradativi, citochine infiammatorie e fattori di crescita, che può influenzare il comportamento delle cellule vicine o anche le cellule all'interno dei tessuti distali (Figura 3). Questi fattori secreti possono interferire con la normale struttura e funzione dei tessuti in coltura.

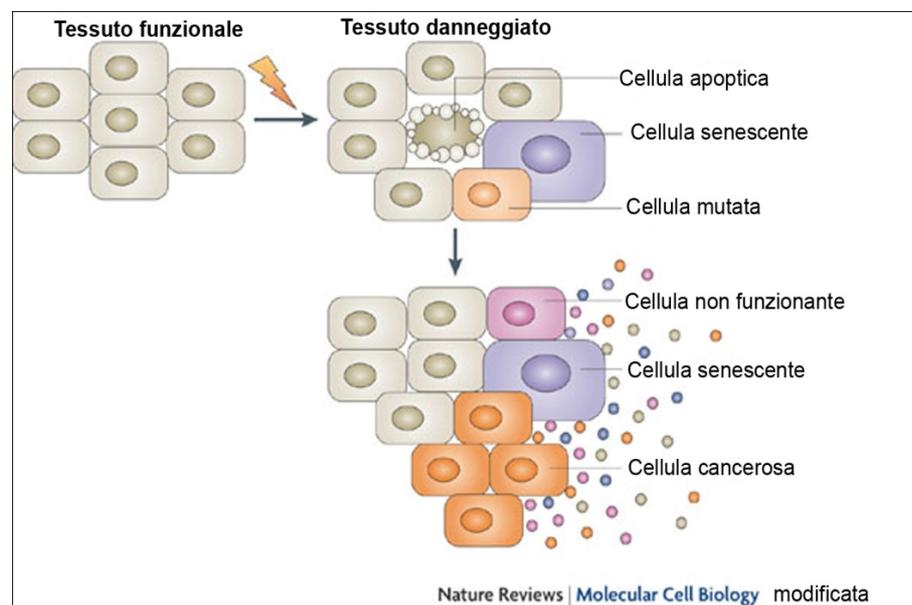
Figura 2



Il controllo della senescenza tramite il *pathway* P53 e P16-RB

I segnali che inducono la senescenza, compresi quelli che innescano una risposta al danno al DNA (DDR), come molte altre forme di stress, di solito possono coinvolgere o il *pathway* di P53 o di P16-RB. Alcuni segnali, come l'oncogene RAS, può innescare entrambi i *pathway*. P53 è regolato negativamente da E3 ubiquitin-protein ligase HDM2, che ne facilita la degradazione, e HDM2 a sua volta è regolato negativamente dall'*alternate-reading-frame protein* (ARF). L'attivazione di P53 determina il fenomeno della senescenza in parte inducendo l'espressione di P21, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente (CDK), che tra le altre attività, sopprime la fosforilazione e, quindi, l'inattivazione di RB. I segnali di senescenza che coinvolgono il *pathway* P16-RB generalmente sono caratterizzati dall'upregolazione di P16, un altro inibitore delle CDK che impedisce a RB di essere fosforilata e quindi inattivata. RB blocca la proliferazione cellulare, sopprimendo l'attività di E2F, un fattore di trascrizione che stimola l'espressione dei geni che sono necessari per la progressione del ciclo cellulare. E2F può anche limitare la proliferazione inducendo l'espressione di ARF, che coinvolge il *pathway* di P53. Vi è quindi una regolazione reciproca tra i *pathway* di P53 e di P16-RB. L'interazione tra ARF, HDM2, P53, P21, CDK, RB ed E2F è stata riscontrata anche in altri contesti cellulari per esempio, durante il DDR e durante l'arresto della crescita reversibile o transitoria. Non è ancora chiaro come la senescenza sia stabilita, a discapito della quiescenza o della crescita transitoria. È degno di nota, tuttavia, che almeno in coltura, l'upregolazione di P16 non si verifica subito dopo un DDR e non si verifica durante gli arresti di crescita transitori o di quiescenza [da (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007) modificata].

Figura 3



Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

I potenziali effetti deleteri delle cellule senescenti

Danni alle cellule all'interno dei tessuti può portare a differenti esiti. Naturalmente, i danni possono essere completamente riparati, e quindi ottenere il ripristino cellulare e dei tessuti. Danni eccessivi o irreparabili possono causare la morte cellulare (apoptosi), la senescenza o una mutazione oncogena. La divisione di una cellula vicina, o di una cellula staminale o di una progenitrice, può sostituire le cellule apoptotiche. La divisione cellulare, tuttavia, aumenta il rischio di danno al DNA e quindi di mutazione oncogena, lasciando il tessuto con cellule pre-maligne o potenzialmente maligne. Le cellule senescenti, al contrario, non possono essere facilmente sostituite, e il loro numero può aumentare con l'età. Cellule senescenti secernono inoltre vari fattori che possono alterare o inibire il funzionamento delle cellule vicine, con conseguenti disfunzioni cellulari. Questi fattori possono anche stimolare la proliferazione e la progressione maligna delle cellule vicine precancerose. Pertanto, un accumulo di cellule senescenti può sia compromettere la normale funzionalità dei tessuti e favorire la progressione del cancro [Da (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007) modificata].

Inoltre, i fattori secreti dalle cellule senescenti possono stimolare la crescita e l'attività angiogenica delle cellule vicine precancerose, sia in coltura che in vivo. Pertanto, le cellule senescenti, nonostante non siano in grado di formare tumori, possono alimentare la progressione delle cellule vicine quindi facilitare lo sviluppo del cancro negli organismi vecchi. Insieme, questi risultati sostengono l'idea che la senescenza è antagonisticamente pleiotropica e funziona da bilanciante, poichè sopprime il cancro negli organismi giovani mentre lo promuove in quelli con una certa età (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

1.3.4 La senescenza nelle MSC

- **Morfologia**

-- Livello Macroscopico

Le MSC invecchiate in vitro mostrano una morfologia allargata e con maggiori estroflessioni rispetto a quando sono giovani, e contengono inoltre molte fibre da stress d'actina.

Le MSC provenienti da donatori anziani non presentano una morfologia affusolata in vitro, al contrario di quelle provenienti da donatori giovani, che esibiscono una morfologia affusolata nelle fasi iniziali della cultura ed una graduale perdita di essa durante la fase di amplificazione (Baxter et al., 2004).

-- Livello Microscopico (Modifiche cromatiniche)

Il nucleo cellulare è organizzato tra stato eterocromatinico (non accessibile al macchinario trascrizionale) ed eucromatinico (stato di massimo rilassamento), e il giusto bilanciamento tra questi ultimi determina le caratteristiche uniche di ogni cellula.

E' stato dimostrato come un'alterazione a livello cromatinico contribuisca al fenomeno irreversibile della senescenza. Narita e collaboratori notarono, infatti, che le cellule senescenti quando colorate con il DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole) presentavano nuclei caratterizzati da foci eterocromatinici in confronto a cellule giovani, che presentavano al contrario una colorazione nucleare uniforme. Essi notarono inoltre, che la presenza dei foci contenenti numerose proteine modificate, come l'istone ipoacetilato, l'istone H3 metilato sulla lisina 9 (H3K9m) e la presenza del heterocromatin protein 1 (HP1) rendono il DNA resistente alla digestione con nucleasi micrococcica. Pertanto denominarono tali complessi SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) (Narita et al., 2003).

- Proliferazione

-- Unità Formanti Colonie (CFU)

CFU acronimo di "*colony-forming unit*" è usato per descrivere colonie originate da una singola cellula. Risultati discordanti si sono avuti nel numero totali di CFU nel corso dell'invecchiamento: secondo alcune ricerche il numero totale di CFU diminuisce durante l'invecchiamento, mentre altri studi hanno riscontrato nessun cambiamento numerico significativo (Sethe et al., 2006).

In aggiunta alla diminuzione nel numero totale di CFU, è stata evidenziata anche la diminuzione nella grandezza delle colonie nelle MSC senescenti. Colonie grandi sono principalmente composte da cellule affusolate, mentre colonie piccole sono spesso formate da cellule appiattite (senescenti) (Liu, Rando, 2011).

-- Differenziamento

La capacità delle MSC di differenziare nei vari tipi di tessuto è legata all'invecchiamento dell'organismo.

Ancora una volta studi divergenti, mostrano da un lato di non riscontrare modifiche nei rapporti tra i differenti tipi di differenziamento canonico (Adipo-, Osteo-, Condrogenico) e dall'altro canto la perdita della capacità delle MSC di formare osteoblasti per preferire il differenziamento in cellule adipose (adipogenic switch), giustificando in questo modo l'osteoporosi senile.

La potenzialità del differenziamento dei CFU in tri- bi- uni-potenti diminuisce con l'aumentare dell'invecchiamento. Pertanto la frequenza relativa dei cloni bi-potenti aumenta con l'età; mentre quella dei cloni tri-potenti diminuisce, in ogni caso la frequenza assoluta non subisce modifiche (Muraglia et al., 2000).

-- Capacità Replicativa

Uno dei primi segnali dell'invecchiamento in vitro è la diminuzione della attività proliferativa. Al contrario delle cellule embrionali che non mostrano la perdita di questa capacità, il massimo raddoppiamento di popolazione evidenziato nelle MSC è di 30-40 volte e dipende dal donatore e dalla percentuale di densità (confluenza). Molti gruppi hanno osservato una diminuzione efficace della capacità replicativa nelle MSC provenienti da donatori anziani. Tuttavia, in risposta ad opportune stimolazioni, la proliferazione risulta 10-15 volte maggiore nelle MSC giovani rispetto a quelle anziane (Banfi et al., 2000, Baxter et al., 2004, Muraglia et al., 2000).

- **Telomeri**

-- Lunghezza dei telomeri

I telomeri sono regioni ripetitive terminali presenti nei cromosomi (5'-TTAGGG-3') associati a proteine, la cui lunghezza sembra correlata alla vitalità cellulare. La precisa struttura telomerica non è conosciuta, ma si pensa che i telomeri dei mammiferi siano caratterizzati da una struttura circolare con una terminazione a t-loop (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Il loro accorciamento non solo "regola la vita", ma è considerato anche come un meccanismo atto a prevenire la formazione di tumori. Nelle MSC i telomeri sembrano già di partenza essere più corti rispetto a quelli presenti negli osteoblasti e condrociti (Sethe et al., 2006). La disfunzione telomerica innesca una classica risposta di danno al DNA. Il DDR innescato è il DSB (*double-strand break*), e la risposta cellulare che ne consegue è l'arresto cellulare o un eventuale riparo se questo è possibile (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007).

-- Attività della telomerasi

La telomerasi è un enzima coinvolto nel mantenimento della lunghezza dei cromosomi, che aggiunge all'estremità di questi ultimi, nuove unità telomeriche. Questo enzima

contiene una porzione catalitica (*telomerase reverse transcriptase*; TERT) e una parte di RNA che funge da stampo. L'attività enzimatica, riscontrata solo nelle cellule germinali, nelle cellule ES (*Embryo Stem cells*) ed in alcune linee di cellule staminali adulte, declina con l'età (Deiss et al., 1996). Nelle MSC, l'espressione della telomerasi è oggetto di discussione: alcuni lavori ne evidenziano l'assenza, altri invece una leggera attività. Inoltre, studi recenti ipotizzano che l'attività della telomerasi potrebbe essere caratteristica di una rara sottopopolazione di MSC (Zimmermann et al., 2003).

- Markers di senescenza in vitro

La beta-galattosidase (b-Gal) è un enzima associato al metabolismo degli zuccheri ed è presente all'interno dei lisosomi a pH acido. È stato osservato che in cellule senescenti in vitro si ha un aumento dell'attività lisosomiale residua e la b-Gal viene identificata anche a pH acidi prossimi alla neutralità (Campisi, 2005). Aspetto limitante di questo studio è la confluenza cellulare che determina un incremento dell'attività lisosomiale. Pertanto è opportuno evitare che le cellule vadano a confluenza durante tutto il processo di crescita in vitro.

- Danni al DNA

Le lesioni al DNA possono essere indotte da agenti endogeni, come le specie reattive all'ossigeno (ROS) risultanti dal processo metabolico o da agenti esogeni come radiazioni ionizzanti (IR) e UV. Il *patway* attivato per riparare tali danni è dipendente dal tipo di lesione generata. I meccanismi della *Base excision repair* (BER) e del *nucleotide excision repair* (NER) sono attivati quando la lesione coinvolge la singola base del DNA, mentre danni più estesi, che coinvolgono sia il singolo filamento (SSB, *single strand breaks*) o entrambi (DSB) richiedono un meccanismo di riparo come l'*homologous recombination* (HR), il *single strand annealing* (SSA) o il *non-homologous and joining* (NHEJ). In tutti i casi, il danno al DNA attiva una serie di modifiche proteiche coinvolte nel segnalare o nel riparare il danno. Tra tutte le modifiche sono da ricordare la fosforilazione e l'acetilazione della proteina P53, il cui ruolo sembra quello di indirizzare il destino cellulare verso un fenotipo apoptotico e la fosforilazione dell'istone γ -H2A.X, che funge invece solo da marker per il richiamo delle proteine coinvolte nel riparo (Seviour, Lin, 2010).

1.4 “FOCUS ON”:

1.4.1 Modifiche cromatiniche

Una cellula ematopoietica e una neuronale, anche se morfologicamente e funzionalmente diverse, presentano lo stesso corredo cromosomico. La differenza tra le due cellule consiste nella tendenza di ognuna di esse a trascrivere alcuni geni piuttosto che altri. Tale processo permette a ciascuna singola cellula che sintetizza un certo genere di proteine piuttosto che altre, una diversa specializzazione che si rivela con una differente differenziazione funzionale e, che si manifesterà attraverso una disparata moltitudine di strutture e una differente distribuzione della cromatina nucleare.

- Cos'è la cromatina?

La cromatina, così chiamata per la sua sensibilità verso i coloranti, si definisce come una combinazione di DNA e proteine appartenenti in massima parte a una classe di piccoli polipeptidi chiamati istoni. L'unità base della cromatina è il nucleosoma, in altre parole l'unità fondamentale, in cui è ammassata la cromatina, che si compone di una parte centrale costituita da otto istoni (H2A, H2B, H3 e H4) intorno ai quali si avvolge due volte il filamento di DNA (di 146 paia).

Esistono diversi livelli di organizzazione della cromatina:

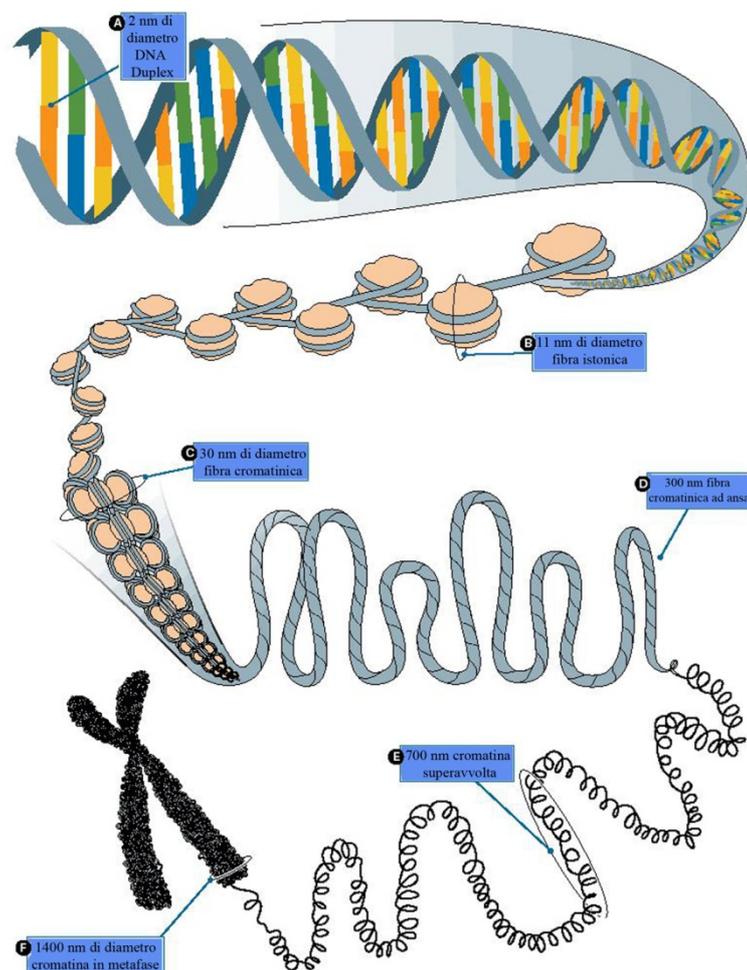
1. La fibra da 11 nm di diametro è il primo livello; è uno stadio detto "filo a collana di perle" per il suo aspetto. In questo stadio il DNA è avvolto attorno ai nucleosomi, senza ulteriori ripiegamenti;
2. La fibra da 30 nm di diametro è il secondo livello. In esso la cromatina assume un aspetto solenoidale grazie alle interazioni tra le code degli istoni di un nucleosoma, con quelle dei nucleosomi adiacenti, nonché grazie agli istoni H1. La fibra da 30 nm è lo stadio in cui si trova la cromatina attiva in interfase (periodo compreso fra due divisioni cellulari), cioè la cromatina che viene trascritta.
3. La fibra da 300 nm di diametro o fibra ad ansa rappresenta l'ulteriore ripiegamento della cromatina su se stessa grazie all'aiuto di altre proteine;
4. La fibra da 700 nm di diametro identifica il super-avvolgimento della cromatina e descrive il diametro dei singoli cromatidi;
5. La fibra da 1400 nm di diametro è il livello di condensazione massimo, quello dei cromosomi mitotici (Figura 4).

A livello genomico è possibile distinguere fondamentalmente due tipi di cromatina; l'eterocromatina e l'eucromatina. La prima rappresenta lo stato più condensato al quale l'apparato trascrizionale non riesce ad accedere. La trascrizione del DNA in RNA avviene solo quando l'eterocromatina si disperde, diminuendo il proprio grado di condensazione (eucromatina), divenendo accessibile alle molecole di RNA-polimerasi.

Il meccanismo con il quale è regolata la cromatina di ordine superiore non è ancora conosciuto, ma sembra essere strettamente legato con i sistemi regolatori a livello del nucleosoma (Felsenfeld et al. 2004).

Gli enzimi di rimodellamento della cromatina si dividono in due categorie fondamentali: quelli, che aggiungono o rimuovono modifiche covalenti agli istoni e quelli, che utilizzano l'energia di idrolisi dell'ATP per modificarne la struttura. Della prima classe fanno parte quegli enzimi, che, post-traduzionalmente, modificano l'estremità amino-terminale delle proteine istoniche con l'aggiunta di un gruppo acetile, metile, fosfato, sumo, o di ubiquitina. Queste modifiche possono sia attivare che reprimere l'espressione genica (Saladi, de la Serna, 2010).

Figura 4



Compattamento della cromatina

Questo schema mostra alcuni dei molti livelli di compattamento della cromatina che da origine al cromosoma mitotico altamente condensato [da sntsas37.wordpress.com modificata].

La seconda categoria di enzimi di rimodellamento della cromatina è composta da enzimi che utilizzano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per modificare i contatti tra proteine istoniche e DNA e indurre cambiamenti nella conformazione nucleosomica. Gli enzimi ATP dipendenti, che rimodellano la cromatina, aumentano o diminuiscono l'accessibilità al DNA. Tre famiglie ben caratterizzate di enzimi ATP-dipendenti rimodellano la cromatina (SWI/SNF, ISWI, CHD) e sono implicati nella regolazione di alcuni aspetti delle cellule staminali come la pluripotenza. Tali enzimi sono costituiti da varie subunità contenenti una porzione catalitica con un dominio ATPasi.

Le tre famiglie si distinguono per la porzione catalitica, che negli eucarioti differisce secondo il contesto cellulare.

Il complesso SWI/SNF, che appartiene alla seconda classe è costituito da 9-12 subunità e la porzione catalitica è rappresentata da BRG1 o BRM ([Saladi, de la Serna, 2010](#)).

- Il complesso SWI/SNF

I complessi SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) idrolizzano l'ATP modulando così la posizione dei nucleosomi e svolgendo un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica. Essi, quindi, sono necessari per rimodellare la cromatina ed esercitano questa funzione attraverso una delle due subunità catalitiche presenti nei complessi: *brama-related gene 1* (BRG1) o *brama* (BRM).

La caratteristica, che distingue questa famiglia d'enzimi, è la presenza di un "*bromodomain*", che interagisce preferenzialmente con gli istoni acetilati presenti nella subunità catalitica sia di BRG1 che di BRM. Sebbene BRG1 e BRM possano entrambe funzionare come siti ATPasici a ognuna è decretata in modo univoco una diversa attività biologica. I due geni presentano un'omologia di sequenza del 75%, ma la loro funzione sulla biologia della cromatina è poco conosciuta ([Bourgo et al., 2009](#)). Per il loro ruolo chiave nel rimodellamento della cromatina, il complesso SWI/SNF è coinvolto in molti

aspetti della regolazione genica, infatti, circa il 5% dell'intero genoma umano è regolato da tale complesso (Sudarsanam, Winston, 2000).

Nelle cellule eucariotiche, SWI/SNF svolge un ruolo cruciale nell'attivazione di un insieme diversificato di geni poiché ne recluta direttamente i fattori trascrizionali. Il complesso agisce anche come repressore trascrizionale. E' stato inoltre dimostrato come la mancata funzionalità di questo complesso sia coinvolta in diverse forme tumorali (Gunawardena et al., 2007).

I complessi SWI/SNF osservati *in vitro*, sembrano più eterogenei rispetto a quelli osservati *in vivo*, essi sono costituiti sempre da una delle due subunità ATPasi e da una composizione variabile di subunità (Bafs) (Saladi, de la Serna, 2010).

I complessi SWI/SNF sono classificati in due sottofamiglie principali: Baf e Pbf (polybromo). I complessi Pbf si distinguono da quelli Baf per l'incorporazione di due subunità aggiuntive, Baf180 e Baf200 e per la mancanza di Baf250. Gli enzimi SWI/SNF sono ben noti per la loro funzione nel differenziamento cellulare. Recenti studi hanno inoltre dimostrato il ruolo cruciale dei complessi SWI/SNF nella pluripotenza delle cellule ES (Boyer et al., 2006) (Figura 5).

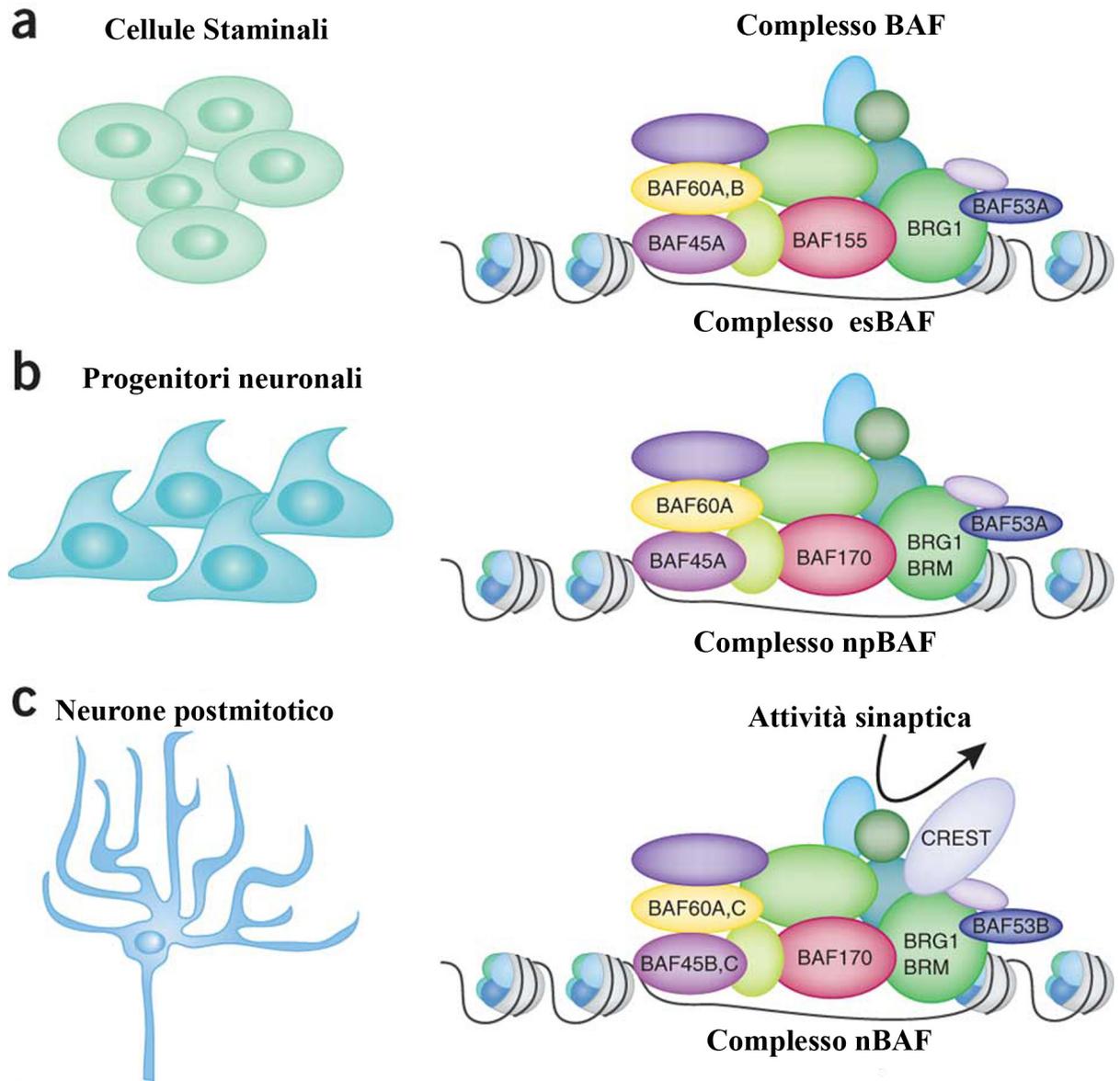
La sola mancanza della subunità BRM non dà luogo a mortalità embrionale, bensì quella di BRG1 è letale nelle fasi precoci della blastocisti. Quest'ultimo è inoltre necessario per l'attivazione di quei geni coinvolti nella riprogrammazione della totipotenza delle ES e per il continuo sviluppo. È interessante notare, come gli zigoti derivati da ovociti dove BRG1 era stato silenziato, presentassero ridotti livelli di trascrizione e bassa metilazione dell'istone H3, suggerendo come BRG1 sia necessario per l'attivazione trascrizionale. In contrasto con quanto affermato in precedenza, BRG1 ha la capacità di legare OCT4 SOX2 e di reprimere la pluripotenza favorendo in questo modo il differenziamento cellulare (Saladi, de la Serna, 2010). Si deduce allora, che BRG1 giochi un ruolo dinamico nella regolazione dell'espressione genica regolando positivamente la trascrizione nelle prime fasi dello sviluppo per poi reprimerla in seguito e favorirne il differenziamento. Differenti studi suggeriscono che il diverso funzionamento di ciascun complesso scaturisce dalla diversa combinazione dei BAF che lo compongono, in particolare Baf250a è presente prima che la cellula inizi il differenziamento mentre la subunità Baf250b è presente in maggior misura dopo il differenziamento (Saladi, de la Serna, 2010).

1.4.2 Modifiche nella proliferazione

Il self-renewal, come una struttura della cromatina lassa e quindi con una maggioranza di geni potenzialmente trascrivibili sono prerogative della cellula staminale. Per

l'appunto come già in precedenza affermato la perdita della capacità proliferativa è sinonimo di senescenza e quindi d'invecchiamento, che si traduce con l'uscita dal ciclo cellulare.

Figura 5



omplessi BAF durante il differenziamento.

Un certo numero di subunità del complesso BAF sono attivati durante il differenziamento neuronale (a, b, c). Alcune subunità sono intercambiabili tra di loro altre invece sembrano essere mai sostituite [da Riccio et al. 2010 modificata].

- Cosa si intende per Ciclo cellulare?

Il ciclo cellulare è costituito da una serie di eventi ordinati, che sopraggiungono nelle cellule eucariotiche tra una divisione cellulare e quella successiva. Durante questo periodo la cellula duplica il proprio DNA, per poi dividerlo in modo equo con la cellula figlia, affinché le due cellule risultanti abbiano lo stesso corredo cromosomico.

Esso può essere schematicamente diviso in 4 fasi: fase G_1 , fase S, fase G_2 e fase M. Durante la fase G_1 si verifica un forte aumento di RNA e proteine, che serviranno per duplicare il DNA, che avviene invece nella fase S. Durante la fase G_2 , dove il DNA è oramai duplicato, si riscontra un aumento del volume della cellula. Nella fase M (mitosi) avvengono invece tutti quegli eventi che portano alla formazione di due cellule uguali tra di loro (citocinesi).

Le molecole chiavi, che regolano il ciclo cellulare, sono le cicline e le chinasi dipendenti da cicline (CDK). Le cicline non presentano attività enzimatica al contrario delle chinasi che presentano tale attività, ma non possono svolgerla se non legate alle cicline. Da questo si deduce che solo il complesso ciclina-CDK ha attività enzimatica.

I diversi complessi ciclina/CDK sono regolati da:

1. controllo dell'espressione e degradazione delle cicline
2. attivazione o inibizione della fosforilazione o della defosforilazione delle CDK
3. modulazione dell'espressione degli inibitori delle CDK (CDKi).

La concentrazione delle cicline cambia durante il ciclo cellulare. Ad esempio durante la fase G_1 è espressa la ciclina D che invece non è ritrovata nella fase M. Le CDK al contrario sono regolate da fosforilazione e defosforilazione su alcuni residui amminoacidi. Le CDKi, invece, regolano negativamente il ciclo cellulare andando a competere con le CDK. Esse si dividono in due classi: la prima include $P21^{CIP1}$ e $P27^{KIP1}$ che si legano alle CDK nella fase G_1/S . La seconda classe comprende la famiglia INK4 ($P15^{INK4B}$, $P16^{INK4A}$, $P18^{INK4C}$ e $P19^{INK4D}$), che interagiscono principalmente con la ciclina D.

Il sistema di controllo del ciclo cellulare è costituito da una famiglia di proteine, che regolano l'entrata della cellula nei diversi stadi del ciclo cellulare, fungendo come una sorta d'interruttori binari rigidamente programmati, che possono essere alternativamente in uno stato "spento" o in uno "acceso", senza possibilità intermedie e in modo irreversibile. Esse sono poi in grado di rilevare il comportamento della cellula durante il ciclo cellulare, così da ritardarne l'entrata in una determinata fase qualora essa non sia ancora pronta perché, ad esempio, non risponde a requisiti essenziali per il passaggio da una fase all'altra. Una volta che nella cellula, a causa del ritardo concesso

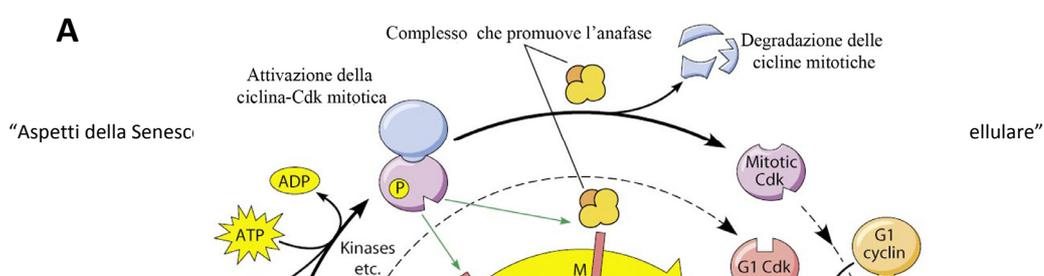
dal sistema di controllo, sono stati completati tutti i cambiamenti essenziali per passare di fase, il ciclo cellulare può riprendere. Il sistema di controllo, poiché svolge un compito fondamentale per la cellula, deve essere molto affidabile. Nella maggior parte delle cellule degli eucarioti, il sistema di controllo possiede tre stazioni regolatrici fondamentali per il proseguimento del ciclo cellulare, dette “punti di controllo” (*checkpoints*). Nel momento in cui la cellula rileva problemi al suo interno o all'esterno, può innescare meccanismi che bloccano il ciclo cellulare in uno di questi tre punti. Il punto più importante è quello collocato nella Fase G_1 , chiamato *Start*, punto di restrizione o punto di non ritorno, oltrepassato il quale la cellula è obbligata a completare l'intero ciclo cellulare (Figura 6). Alcuni fattori trascrizionali, chiamati E2F, giocano un ruolo chiave in questo punto, poiché si legano a sequenze specifiche di DNA nei promotori di molti geni, che codificano proteine richieste per l'ingresso nella fase S. I fattori trascrizionali sono regolati a loro volta da un'altra proteina denominata proteina del retinoblastoma o pRB. Durante la fase G_1 , pRB si lega a E2F e blocca la trascrizione dei geni della fase S. Quando le cellule sono stimolate a dividersi in seguito a segnali extracellulari il complesso G1-CDK attivato, si accumula e fosforila pRB, riducendone l'affinità per E2F, pRB si dissocia, permettendo a E2F di attivare l'espressione dei geni della fase S. Si deduce come pRB occupi un ruolo importantissimo nella cellula, infatti, mutazioni a carico di questa proteina, si riscontrano nella maggior parte dei tumori. Essa condivide la funzione regolatoria dei fattori trascrizionali E2F con altre due proteine ossia RB2/P130 e P107. Queste proteine appartengono alla stessa classe proteica che prende il nome di famiglia genica del retinoblastoma (Giordano e Galderisi, 2010).

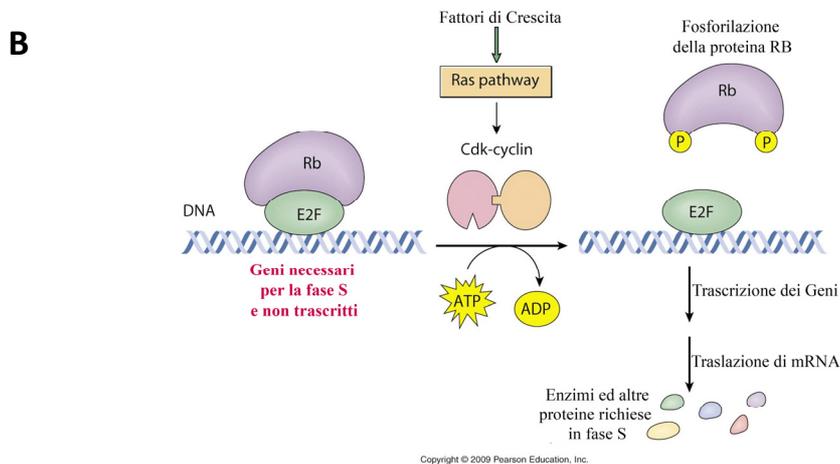
- La famiglia genica del Retinoblastoma

La famiglia genica del retinoblastoma include tre membri: pRB, RB2/p130 e P107.

Le tre proteine mostrano un'elevata omologia di sequenza, in modo particolare in due domini definiti A e B, che intervallati da un'ulteriore regione denominata *spacer* formano insieme il cosiddetto *pocket domain*, responsabile dell'interazione con i fattori trascrizionali E2F (Paggi, Giordano, 2001). Questo dominio ha la capacità di interagire anche con altri tipi di proteine come quelle oncovirali, incluso l'adenovirus E1A, SV40 del papilloma visus E7, ognuno dei quali ostacola l'interazione con E2F (Lee et al., 1996).

Figura 6





Schema rappresentativo del ciclo cellulare.

A) Sono rappresentate le quattro fasi del ciclo cellulare e le relative cicline che intervengono durante l'intero ciclo.

B) In dettaglio è mostrato quello che accade nel punto di restrizione. Durante la fase G1, pRB si lega a E2F e blocca la trascrizione dei geni della fase S. Quando le cellule sono stimolate a dividersi in seguito a segnali extracellulari il complesso G1-CDK attivato, si accumula e fosforila pRB, riducendone l'affinità per E2F, pRB si dissocia, permettendo a E2F di attivare l'espressione dei geni della fase S [da Pearson Education Inc. modificata].

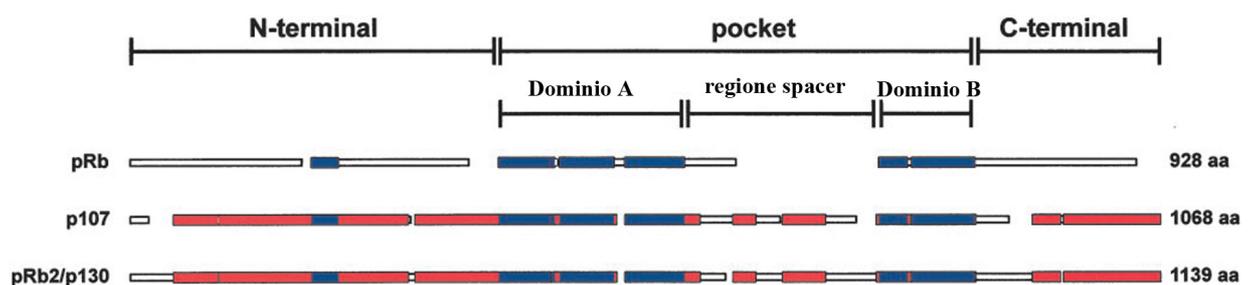
Accanto alle regioni A e B, dove le tre proteine condividono un'ampia omologia di sequenza, la regione *spacer* che divide i sottodomini A e B sembra caratterizzare in modo univoco le proteine della famiglia del retinoblastoma (Figura 7). P107 e RB2/P130 allo stesso tempo mostrano una maggior omologia anche nella regione *spacer* rispetto a pRB. L'elevata omologia tra questi due membri della famiglia è rappresentata dalla

possibilità che le due proteine possano sostituirsi a vicenda nel legare i fattori trascrizionali E2F4 e E2F5. Principalmente il legame p130-E2F4/5 si ritrova in cellule quiescenti mentre quello p107-E2F4/5 in cellule ciclanti. pRB presenta una maggior affinità per i fattori trascrizionali E2F1, 2 e 3 coinvolti principalmente nella repressione trascrizionale, inoltre, in alcuni distretti cellulari pRB ha anche la capacità di legare E2F4 (Dannenberget al., 2000).

Il ruolo di questi geni è complesso, poiché dipende da diversi parametri: specie animale, tipo di cellula, status della cellula (cellula staminale, progenitrice o differenziata). Per meglio comprendere le differenze e similitudini delle proprietà onco-soppressive delle tre proteine si ricorre alla descrizione di alcuni studi. In fibroblasti di topo cresciuti in terreno normale, dove è stato eliminato RB è stato evidenziato un minore numero di cellule in fase G₁ ed un aumento di quelle in fase S. Nessuna modifica ha riguardato la fase G₂. Nelle medesime cellule dove è stato indotto il blocco del ciclo cellulare in fase G₁, eliminando il siero (*serum starvation*), prima di silenziare RB si è manifestato, invece, un maggior numero di cellule in fase G₁ (Herrera et al., 1996).

La completa inattivazione di RB non sembra essere compatibile con la vita: i topi ko (*knock-out*) presentano un'estesa apoptosi nel sistema nervoso centrale, la presenza di retinoblastoma e difetti dell'eritropoiesi e miogenesi. Questi difetti potrebbero almeno in parte essere attribuiti a un aumento dell'attività di E2F1, che innesca l'apoptosi tramite la via P53. Al contrario, il ko genetico di P107 o RB2 non ha mostrato un fenotipo sovrapponibile a quello con RB (Cobrinik et al., 1996, Lee et al., 1996). Si è però dimostrato come la combinazione del ko per P107 e RB2 causa un'eccessiva proliferazione nei condrociti portando alla malformazione delle ossa lunghe e delle costole con l'aggiunta di problemi respiratori, che hanno indotto una rapida morte neonatale (MacPherson et al., 2003).

Figura 7



Omologia di sequenza tra i membri della famiglia del Retinoblastoma. Analisi delle affinità strutturali tra le proteine della famiglia del Retinoblastoma. pRB, p107 e RB2/P130 sono allineati secondo un'omologia di sequenza aminoacidica. Le zone blu sono sequenze altamente omologhe tra le tre proteine; queste caselle corrispondono sostanzialmente al *pocket domain* in cui sono contenuti i domini "A" e "B". Le zone in rosso, sono regioni omologhe condivise solo tra p107 e RB2/p130. Le zone bianche, sono regioni non omologhe [da Paggi, Giordano, 2001 modificata].

I topi deficienti di RB a livello cardiaco non mostrano alcuna differenza con i controlli, sia per quanto riguarda la forma e il peso che per il modo di funzionare. La mancanza di un fenotipo evidente in questi topi fa dedurre come RB2 sostituisca funzionalmente RB nel sistema cardiaco (MacLellan et al., 2005). Anche nei fibroblasti di topi (MEF) si osserva un effetto complementare da parte di pRB quando non è presente pRB2/P130 ed in particolar modo in assenza di pRB2/P130 il complesso E2F4 lega p107, mentre quando è assente anche P107, lega pRB. Sembra quindi che le tre proteine si compensino a vicenda nel legare E2F4 per poter bloccare la progressione del ciclo cellulare (Sage et al., 2003).

I geni E2F sembrano non subire alcuna modifica nell'espressione quando manca RB2 o P107, al contempo la mancanza di entrambi, evidenzia la riduzione dell'espressione di alcuni geni tra cui B-MYB, CDC2, E2F1, TS e Ciclina A2. I livelli d'espressione di queste proteine risultano, invece, normali quando manca RB e, inoltre, si osserva una up-regolazione dei geni Ciclina E e P107.

Nondimeno, l'over-espressione di uno di questi membri *in vitro* determina l'arresto cellulare con un aumento della fosforilazione della Ciclina D/CDK4,6 confermando così il ruolo di questi geni nel regolare il ciclo cellulare (Dannenbergh et al., 2000).

1.5 Interazione tra i membri della famiglia RB e i complessi SWI/SNF

La struttura della cromatina presenta il massimo addensamento nella fase mitotica del ciclo cellulare poiché si ipotizza che i rimodellatori della cromatina come i complessi SWI/SNF siano inibiti. Tale ipotesi è avallata dal fatto che, durante il processo mitotico i complessi contenenti la subunità catalitica BRM sono degradati, mentre quelli contenenti la subunità BRG1 sono disattivati mediante fosforilazione ((Wang et al., 1996)). Non appena la cellula supera la fase mitotica, i complessi contenenti la subunità BRG1 vengono defosforilati e pertanto sono attivi per modificare la cromatina. Tali complessi esercitano un ruolo chiave anche nella fase G1 del ciclo cellulare. Alcuni studi hanno mostrato l'interazione dei complessi SWI/SNF, in particolar modo con la subunità BRG1 e la ciclina E. In particolare, l'espressione ectopica del solo BRG1 in cellule normali provoca l'arresto del ciclo cellulare, mentre la co-trasfezione di BRG1 e della Ciclina E potrebbe essere causa di morte. BRG1 è anche richiesto per la trascrizione di CD44, una molecola di adesione, utilizzata come *marker* per diagnosticare metastasi. E' stato dimostrato come la co-trasfezione di BRG1 e della Ciclina E attenui l'espressione di CD44. La stessa ciclina E presenta la capacità di fosforilare BRG1 e la subunità BAF155

(Kang et al., 2004). Questi dati evidenziano come il silenziamento di BRG1 sia strettamente legato alla regolazione del ciclo cellulare. Vi sono diverse possibili spiegazioni a questo fenomeno, tra cui quella che afferma che i complessi abbiano la capacità di legare diversi fattori trascrizionali. Il legame maggiormente documentato è quello che avviene tra BRG1 e il membro della famiglia del Retinoblastoma RB. Tale interazione è stata scoperta per la prima volta nei lieviti e avviene tra una porzione del cDNA di BRG1, contenente il dominio LXCXE, ed il *pocket domain* di RB. Questo dominio ha la capacità di legare altre proteine, tra cui, come discusso in precedenza, l'adenovirus E1A, SV40 del papilloma visus E7, e le HDAC1 e 2 (Naidu et al., 2009). L'interazione tra BRG1 e RB si manifesta soprattutto quando quest'ultima è ipofosforilata. Tali eventi causano la repressione d'alcuni geni E2F-dipendenti coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, come la ciclina A e la ciclina E. Diversi studi hanno mostrato come l'interazione tra RB, BRG1 ed E2F svolga un ruolo fondamentale nell'arresto della progressione del ciclo cellulare. In particolar modo in cellule SW13 (ossia cellule, che non presentano BRG1 e BRM, mentre esprimono RB) è stato dimostrato che se si over-esprimeva una delle due subunità catalitiche, le cellule incorrevano nell'arresto del ciclo cellulare, mentre questo effetto non era più evidente se si co-trasfettavano con l'Adenovirus E1A, che blocca la famiglia del retinoblastoma (Zhang et al., 2000).

1.5.1 I rispettivi ruoli di BRM, BRG1 e RB

Il ruolo di BRM, BRG1 e RB nell'arresto della crescita è ancora molto dibattuto. È evidente che sia BRG1 che BRM possano collaborare con RB nel regolare l'espressione (Strober et al., 1996). Tuttavia, in coltura, il livello di espressione di Brm è più basso durante la crescita esponenziale. Per esempio nelle cellule NIH3T3, BRM si accumula nella fase G0, e diventa quasi irrilevante quando le cellule sono stimolate dall'aggiunta di siero. D'altra parte, BRG1 è abbondante per tutto il ciclo cellulare (Muchardt et al., 1998). BRM può svolgere un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare; infatti la reintroduzione in fibroblasti trasformati porta alla reversione del fenotipo (Muchardt et al., 1998). In questo stesso tipo d'esperimento, BRG1 non ha mostrato gli stessi effetti di BRM, perché probabilmente l'espressione ectopica di BRG1 porta alla down-regolazione del gene endogeno, mantenendo i livelli totali della proteina sostanzialmente costanti. È quindi probabile che BRM e BRG1 abbiano lo stesso ruolo sul ciclo cellulare, ma che siano regolati in modi molto differenti. BRG1 può essere la proteina più importante durante l'interfase, in cui è presente in quantità elevata e regolata dalla fosforilazione. I livelli del complesso SWI/SNF possono quindi regolare, grazie all'interazione con RB, il

processo di crescita cellulare e quindi di senescenza e di differenziamento (Kang et al., 2004).

2. SCOPO DEL LAVORO

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

L'invecchiamento è un processo naturale e irreversibile che comporta una serie di modificazioni biologiche, morfologiche e psicologiche ed è inoltre caratterizzato da una riduzione delle abilità psicofisiche e da una progressiva involuzione morfologica e strutturale.

Lo studio dei fenomeni dell'invecchiamento a livello cellulare è più semplice rispetto alle ricerche epidemiologiche e cliniche, perché nel primo caso si possono tenere ben distinti i fattori relativi all'invecchiamento in sé e per sé da quelli provocati dalle malattie che spesso accompagnano l'età avanzata. I grandi lavori di ricerca sull'invecchiamento delle cellule sono stati eseguiti utilizzando fibroblasti provenienti dalla pelle umana, posti in coltura in particolari condizioni. I fibroblasti umani, i quali mostrano una limitata proliferazione *in vitro* prima di entrare stabilmente in arresto.

La senescenza replicativa compromette inoltre la crescita in piastra delle cellule staminali adulte, limitandone così i loro usi terapeutici. Il trapianto di cellule staminali costituisce una prospettiva di considerevole interesse, per molte malattie come il diabete di tipo 1, il morbo di Crohn, il morbo di Parkinson ed etc.

Le cellule staminali mesenchimali oggetto di questo studio, si prestano particolarmente bene al trapianto poiché sono facilmente isolate da un distretto accessibile e presentano una spiccata attività immunomodulatoria che le rende adatte al trapianto autologo ed eterologo. Per quanto concerne la capacità di raggiungere il tessuto danneggiato, solo una piccola parte è in grado di farlo, mentre la restante finisce nella fitta rete degli alveoli polmonari, da dove esercitano la loro attività immunomodulatoria. Infine, per l'esiguità del numero di cellule presenti in un aspirato midollare, è opportuno ricorrere all'amplificazione *in vitro*. Tale procedura correlata alla stabilità genetica delle MSC risulta essere efficiente per il loro incremento, ma al contempo inefficiente perché soggetta al fenomeno della senescenza replicativa discussa ampiamente in precedenza.

Il lavoro sperimentale, svolto durante questi tre anni di dottorato è stato, dunque, finalizzato all'analisi di geni quali BRG1 e i membri della famiglia del retinoblastoma, che sembrano avere un ruolo in questo fenomeno.

BRG1 costituisce la porzione catalitica dei complessi SWI/SNF (*SWIth/Sucrose Non-Fermentable*) i quali idrolizzano l'ATP modulando così la posizione dei nucleosomi e giocando un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica. E' stato dimostrato come un'alterazione a livello cromatinico contribuisca al fenomeno irreversibile della senescenza.

Il ruolo principale, invece, dei membri della famiglia del retinoblastoma è la regolazione del ciclo cellulare, come repressori dei fattori trascrizionali E2F. La progressione del ciclo cellulare è una prerogativa della staminalità, poiché cellule senescenti escono dal ciclo cellulare per entrare in una fase G0 e diventare incapaci di rispondere a qualsiasi stimolo esterno.

Come ampiamente discusso in precedenza, è stato dimostrato che esiste un'interazione tra i complessi SWI/SNF, in particolar modo della subunità BRG1 con il *pocket domain* del gene RB. In particolare svariati studi hanno focalizzato la propria attenzione sul gene RB ed hanno trascurato il ruolo dei geni RB2/P130 e P107, inoltre hanno utilizzato una proteina virale SV40 capace bloccare tutti i membri della famiglia contemporaneamente. Alla luce di quanto esposto qui sopra, l'obiettivo di questo studio è di valutare il ruolo dei geni dei complessi SWI/SNF e dei membri della famiglia del retinoblastoma allo scopo di comprendere gli aspetti più fini della biologia delle cellule staminali, e quindi della senescenza. In particolare, in questo lavoro si è deciso di studiare gli effetti funzionali di questi geni singolarmente al fine di chiarire in maniera più dettagliata il loro ruolo nella proliferazione, crescita e differenziamento delle MSC e poter quindi dare un importante contributo al possibile utilizzo in campo clinico di queste cellule.

Gli esperimenti sono stati svolti avvalendomi della tecnica della *RNA interference*, per indurre la down-regolazione dei geni d'interesse. La scelta di questa tecnica, è dovuta al fatto di voler mimare il fenomeno naturale che la cellula usa per spegnere l'espressione di alcuni geni. Gli effetti di ciascun silenziamento indotto sono stati analizzati per valutare un eventuale effetto sul fenomeno della senescenza, a tal proposito sono stati svolti esperimenti di citochimica, di citotossicità cellulare, d'immunocitochimica, d'immunofluorescenza, e saggi di RT-PCR e Wester-Blot per valutare l'espressione genica e proteica.

2. MATERIALI E METODI

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

3.1 Culture di MSC

Il midollo osseo da cui sono state ricavate le MSC è stato prelevato da bambini sani dopo consenso informato presso la sezione di oncologia pediatrica della Seconda Università di Napoli responsabile Dott.ssa Fiorina Casale.

Il midollo osseo è stato diluito con un volume di PBS(Phosphate buffered saline) (0,9% NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.4 senza calcio e magnesio) (Invitrogen), e successivamente caricato su un gradiente di densità di Ficoll (GE Healthcare), per permettere la separazione della frazione di cellule mononucleari, dopo centrifugazione a 3000rpm, per 30 minuti (min).

La frazione nucleare depositata subito prima del Ficoll è stata raccolta con una siringa e lavata con PBS. Le cellule sono state piastrate in piastra Petri da 100mm, in mezzo MEM α (α Modified Eagle's Medium) (EuroClone, Italia), contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) (EuroClone, Italia), 2mM L-glutamina (EuroClone, Italia), 100 U/mL penicillina (EuroClone, Italia), 100 μ g/mL streptomina (EuroClone, Italia), 2 ng/mlFGF (questo mezzo sarà di seguito indicato come mezzo di proliferazione, PRO). Dopo 24 ore le cellule non aderenti sono state scartate e le cellule aderenti, le cellule staminali stromali, sono state lavate due volte in PBS. Le cellule sono state poi incubate per 7 – 10 giorni in incubatore ad atmosfera umidificata a 37°C, contenente il 5% di CO₂, fino a raggiungimento della massima confluenza.

Dopo il primo passaggio, quando le cellule raggiungevano una densità del 70-80%, sono state staccate mediante trattamento con tripsina e ripiastrate nelle stesse condizioni colturali. Per eseguire la tripsinizzazione, il mezzo di coltura è aspirato, sono effettuati due lavaggi in PBS cui sono aggiunti 100 U/mL di penicillina e 100 μ g/mL di streptomina. I lavaggi sono stati eseguiti eliminando il mezzo di coltura dalle piastre, aggiungendo circa 6 mL di PBS e agitando delicatamente la piastra; dopo aver eliminato il PBS, viene aggiunto 1,5 mL di soluzione 0.02% EDTA-0,025% tripsina (Invitrogen) e le cellule sono poste nell'incubatore per 10 min. Infine si aggiunge 1,5 mL di MEM α , si passano le cellule varie volte attraverso una pipetta da 10 mL al fine di rompere gli aggregati cellulari, quindi si ripone in nuove piastre 1/3-1/4 del volume prelevato a seconda della densità cellulare, si aggiunge un adeguato volume di mezzo di coltura e si rimettono le piastre nell'incubatore.

Tutto il lavoro sulle cellule è stato eseguito utilizzando una cappa a flusso laminare verticale (Pabisch, mod. StarBiosafe), per evitare contaminazioni.

3.2 Produzione di adenovirus

Il siRNA-BRG1, è stato progettato con il supporto di un sito internet siSerch creato da Chalk, Wahlestedt e Sonnhammer ([Chalk et al., 2004](#), [Chalk et al., 2005](#)). Il siRNA-CTRL utilizzato invece è disegnato in modo tale che la sequenza non sia complementare ad alcun mRNA.

Tali adenovirus sono stati preparati co-trasfettando il plasmide adenovirale pAd-CMVlink-1, senza inserto o con il gene BRG1, posto a valle del promotore CMV, e Cla I Ad 5 DNA, che contiene i geni per le strutture virali. Le cellule trasfettate sono le cellule embrionali renali umane 293, ingegnerizzate per fornire in trans i geni E1A ed E1B, necessari al virus per compiere il ciclo litico. I virus ricombinanti sono stati purificati e utilizzati per la trasduzione.

3.2.1 Espansione di adenovirus in vitro

Per l'amplificazione degli adenovirus sono utilizzate le cellule 293. Tali cellule sono state trasdotte con un'aliquota dell'adenovirus di partenza in D-MEM + 2% FBS e poste in incubatore a 37°C in genere tra 24 e 48 ore e cioè fino al momento in cui all'osservazione microscopica non è stato evidente l'effetto citopatico.

Le cellule e il mezzo sono stati raccolti e sottoposti a tre cicli di congelamento (-80°C per almeno 2 ore)/scongelo (+37°C) per facilitare la rottura delle membrane cellulari e il rilascio delle particelle adenovirali nel mezzo; in seguito il mezzo contenente le cellule trasdotte è stato centrifugato per 10' a 2000 rpm (centrifuga ALC mod. 4236) ed è stato prelevato il supernatante, che contiene le particelle virali, mentre il pellet contiene i frammenti cellulari. Al supernatante si aggiunge 10% glicerolo sterile e si divide in aliquote che vengono conservate a -80°C.

3.2.2 Determinazione del titolo adenovirale

Il metodo di titolazione è quello riportato dalla ditta Quantum. Si piastrano 10.000 cellule 293 in multiwell da 96 per pozzetto in 100 µL D-MEM +5% FBS e si pongono in incubatore a 37°C, per farle aderire al substrato. Si eseguono quindi, diluizioni seriali

dell'aliquota adenovirale da titolare in D-MEM +2%FBS, in genere in un intervallo sperimentale compreso da 10^{-1} a 10^{-12} . Si aggiungono 100 μ L di diluizione per pozzetto (si utilizzano dieci pozzetti per ogni diluizione) e la piastra si ripone in incubatore a 37°C per 10 giorni.

Si contano, dopo questo tempo, i pozzetti in cui è ben visibile l'effetto citopatico e si ottiene quello che viene definito T=TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose)

$$T = 10^{1+d(S-0,5)}$$

Dove:

d = 1 per un fattore di diluizione 10

S = 0,1 per ogni pozzetto in cui è visibile l'effetto citopatico

Affinché il valore T risulti uguale al valore PFU/ml, (Plack Forming Unit) bisogna sottrarre un valore di correzione sperimentale stimato in 0,7 log.

La titolazione è effettuata in duplicato per ogni virus, ottenendo poi un valore di PFU/mL media di entrambi gli esperimenti.

Per determinare la quantità di virus da utilizzare, espressa in MOI (molteplicità di infezione), equivalente a PFU/cellula, si utilizza Ad-CMV- β gal. A questo scopo si trasducono le cellule con differenti quantità di adenovirus e si determina la quantità che permette di ottenere un'elevata percentuale di cellule trasdotte, con un effetto citotossico minimo. Le cellule trasdotte sono evidenziate con una colorazione citochimica che evidenzia l'attività β -galattosidasi. Le cellule sono lavate una volta con PBS 1X, fissate con formaldeide 2%, glutaraldeide 0,2% in PBS 1X.

Si lascia in fissativo per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi si rimuove il fissativo e le cellule fissate vengono lavate per 3 volte in PBS.

Infine si aggiunge la soluzione di colorazione (Boehringer), composta dal substrato dell'enzima, X-gal in rapporto 1:20 di *iron buffer*, fornito dalla casa produttrice. Si pongono le cellule in incubatore a 37°C per circa 3 ore. Il risultato del test si osserva al microscopio ottico: le cellule che sono state trasdotte si colorano in blu.

3.2.3 Trasduzione delle MSC

Si piastrano 300.000 cellule in MEM α + 10% FBS, contate alla camera di Bunker, in capsule Petri da 100 mm. Le cellule aderiscono alla piastra, durante le 24 ore di incubazione a 37°C. Il mezzo è poi aspirato e le cellule trasdotte con 200 MOI di Ad-

siBRG1 o AdsiCTRL, in 8 mL di mezzo. Le piastre sono poste nuovamente in incubatore a 37°C per 4 ore. Dopo 4 ore viene aggiunto FBS al 2%.

Il giorno successivo si aggiunge l'8% di siero e rincubate a 37°C per tutta la notte. Il giorno successivo si aspira il mezzo di coltura, le MSC sono lavate in PBS, e poste in 8 mL di DMEM + 10% FBS + 3ng/μL bFGF, e lasciate per 24 ore in incubatore a 37°C.

Tutti gli esperimenti condotti in seguito sono stati eseguiti con queste modalità.

3.3 Trasduzione con vettori Lentivirali

I vettori lentivirali, per silenziare i membri della famiglia del Retinoblastoma, sono stati forniti dal Dott. Flavio Rizzolio, che lavora per la Sbarro Institute di Philadelphia CA, USA.

I siRNA sono stati costruiti seguendo la procedura del consorzio di Broad Institute (Cambridge, MA, USA). Nel dettaglio, per esprimere gli shRNAs, è stata utilizzata la sequenza del vettore pLKO.1 con i relativi siRNA disponibili nel consorzio: clone TRCN0000010418 per il silenziamento di RB (sequenza di riferimento NCBI: NM_000321.2); clone TRCN0000039923 per silenziare RB2/p130 (sequenza di riferimento NCBI: NM_005611.3); clone TRCN0000040022 per P107 (sequenza di riferimento NCBI: NM_183404.1).

Le particelle lentivirali sono state prodotte come descritto (http://www.broadinstitute.org/genome_bio/trc/publicProtocols.html).

1x10⁶ 293FT cellule (Invitrogen, CA, USA) sono state trasfettate con 2,25 mg di plasmide PAX2 che contiene tutte le proteine importanti per l'impallaggio del gene, 0,75 μg di plasmide PMD2G che contiene tutte le proteine del capsido e 3 μg di uno dei tre plasmidi pLKO.1 utilizzando 30 ml di Fugene HD (Roche, Germania) su piastre da 100 mm. La trasduzione delle MSC avviene con 1 MOI (molteplicità di unità infettive) di particelle lentivirali shRNA.

Tre giorni dopo l'infezione, le cellule sono state selezionate con 2 μg/ml di puomicina (Sigma-Aldrich, MO, USA) per una settimana. A questo punto le cellule sono state ampliate a 70 - 80% di confluenza e su queste cellule, salvo diversa indicazione, sono stati eseguiti gli esperimenti successivi.

3.4 Analisi del Ciclo Cellulare

L'analisi al citofluorimetro permette di determinare la fase del ciclo cellulare in cui si trova ogni singola cellula mediante la misurazione della quantità di DNA in essa presente. Tale misurazione si basa sull'utilizzo di un laser che eccita lo ioduro di propidio, una sostanza fluorescente che si intercala nel DNA.

Per ogni saggio sono state utilizzate almeno 500.000 cellule. Al punto temporale di interesse, le cellule sono state staccate e risospese in 500 µl di un buffer ipotonico contenente 0,1% Triton X-100, 0,1% sodio citrato, 50 ng/ml ioduro di propidio, RNasi A, dopodichè sono state incubate per 30 min al buio a temperatura ambiente. I campioni sono stati analizzati con un citofluorimetro a flusso FACSCalibur, utilizzando il software Cell Quest (Becton Dickinson) secondo procedure standard, e i dati sono stati elaborati mediante il software ModFitLT versione 3 (Becton Dickinson).

3.5 Saggio dell'annexina V

L'Annexina V è una proteina che presenta elevata affinità per la fosfatidilserina (PS). L'esposizione della PS sulla membrana cellulare esterna è associata a stadi precoci dell'apoptosi, ben prima che sia possibile vedere la frammentazione del DNA.

Le cellule apoptotiche sono state determinate utilizzando l'Alexa 568-conjugated Annexin V (Roche). Per colorare le cellule apoptotiche è stato eliminato il mezzo di cultura e le cellule sono state incubate con l'Alexa 568-conjugated Annexin V diluita 1:50 in una soluzione contenente 10nM HEPES, pH7,4 (Sigma-Aldrich), 140mM di NaCl (Sigma-Aldrich), 5mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich) per 15 min a temperatura ambiente.

In seguito le cellule sono state lavate con PBS e colorate con 100 µg/mL di Hoechst 33340 (Sigma-Aldrich) per 5 min, dopo aver eseguito un ulteriore lavaggio con acqua bidistillata sono state messe su vetrini con Mowiol (Calbiochem) contenente 2,5% di DARGO (Sigma-Aldrich) ed osservate a microscopio a fluorescenza (Leica Microsystems). In ogni esperimento sono state contate almeno 1000 cellule in ogni campo per calcolare la percentuale di apoptosi.

3.6 Saggio per la valutazione dell'attività della Caspasi 9

Le caspasi sono essenziali nella cellula per attuare l'apoptosi. Ci sono due tipi di caspasi: le caspasi "iniziatrici" (caspasi-2, -8, -9, -10) che tagliano pre-forme inattive di altre

caspasi dette “effettrici” (caspasi-3, -6, -7) attivandole; le *caspasi effettrici* a loro volta taglieranno precisi substrati proteici dando corso al processo apoptotico.

E' stata valutata l'attività della caspasi 9 seguendo le istruzioni del produttore (B-Bridge international, CA, USA). In breve, dopo 1 ora di incubazione di 2×10^5 cellule con il substrato FAMLEHD-FMK per la caspasi 9 le cellule sono state lavate due volte con PBS, tutti i campioni sono stati analizzati con FACS utilizzando un FACSCalibur (BD, NJ, USA) e utilizzando la tecnologia Quest Cell (BD, NJ, USA).

3.7 Saggio della β -galattosidasi

La beta-galattosidasi è un enzima idrolitico che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β -D-galattosio nei polisaccaridi noti come beta-galattosidi, tramite la rottura dei legami beta-glicosidici terminali. A pH 6 l'attività della β -galattosidasi è associata alla senescenza. Una teoria suggerisce che l'attività della β -galattosidasi sia associata con la via metabolica del gene RAS (Minamino, Komuro, 2003) e con la disfunzione dei lisosomi (Kurz et al., 2000).

3.7.1 Saggio nel visibile

Per questo saggio sono state utilizzate 300.000. Le cellule sono state fissate per 10 min con una soluzione al 2% (p/v) formaldeide e 0,2 % (p/v) glutaraldeide. Le cellule sono poi lavate con PBS e incubate a 37°C per 2 ore con una soluzione contenente 30 mM acido citrico/Buffer fosfato (pH6), 5mM $K_4Fe(CN)_6$, 5mM $K_3Fe(CN)_6$, 150mM NaCl, 2mM $MgCl_2$, 1mg/ml X-Gal.

La percentuale di cellule senescenti è stata calcolata contando il numero di cellule blu (positive per la β -galattosidasi) su di un totale di 500 cellule.

3.7.2 Saggio in fluorescenza

4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (4-MUG) è un substrato per β -galattosidasi che non è fluorescente fino a quando l'enzima non lo scinde per generare il fluoroforo 4-methylumbelliferone. Il test è stato effettuato su lisati ottenuti da cellule che sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti, come riportato in letteratura (Gary, Kindell, 2005). La

produzione del fluoroforo è stata monitorata con un'emissione / lunghezza d'onda di eccitazione 365/460nm.

3.8 Saggio TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol)

La telomerasi è un complesso ribonucleoproteico che aggiunge piccole ripetizioni di TTAGGG all'estremità dei cromosomi eucariotici, usando il suo RNA come stampo. In assenza dell'attività telomerica, i telomeri sono accorciati a ogni divisione cellulare, portando all'instabilità del cromosoma e alla morte cellulare. Lo sviluppo di una tecnica molto sensibile come la *Telomeric Repeat Amplification Protocol* (TRAP) ha reso possibile misurare l'attività telomerica. La tecnica è basata sulla capacità della telomerasi di riconoscere e prolungare *in vitro* un substrato artificiale.

Il saggio TRAP è stato eseguito seguendo il protocollo di Kim et al. (Kim et al., 1994, Kim, Wu, 1997). 500.000 cellule sono state lisate in una soluzione 10mM Tris.HCl pH 7,5, 2,5mM MgCl₂ 1 mM EGTA, 0,5% CHAPS 10% glicerolo, 5mM β-mercaptetanololo, 1mM AEBSF per 30 min a 4°C. Il lisato è stato quindi centrifugato a 10.000g a 4°C. Dopo la centrifugazione, la determinazione della concentrazione delle proteine totali è stata determinata con il saggio Bradford. La miscela di reazione per l'analisi del TRAP è stata preparata come segue: 1x di Taq DNA polymerase buffer (Promega, Italia), 1,5 mM MgCl₂, 50μM dNTPs, primer M2(TS) (5'AARCCGT CGAGCAGAGTT-3') controllo interno (5'AATCCGTCGAGCAGA GTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3'). Questa soluzione è stata incubata 30 min a 25°C, prima che venisse aggiunto il primer ACX (5'-GCGCGG[CTTACC]₃ CTAACC-3'), primer NT (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'), 2,5U Taq DNA polymerase (Promega, Italia). La reazione è stata denaturata per 3 min a 94°C, e quindi amplificata per 30-35 cicli (94°C per 15 sec, 60°C per 15sec, 72°C per 15sec). I primers ACX e M2(TS) amplificano i prodotti della telomerasi, mentre i primers M2(TS) a NT amplificano il controllo interno. I prodotti di PCR sono stati risolti su un gel al 20% di poliacrilammide.

3.8.1 Preparazione del gel di poliacrilammide

Per la preparazione del gel di separazione è stato seguito il seguente protocollo: 30% Acrilammide/Bis (29:1) (Biorad), TBE 10x, H₂O DEPC, 0,5%TEMED (Biorad), 10% APS.

La soluzione è stata versata nell'apposito stampo, formato da due lastrine di vetro separate da due spaziatori di spessore 1mm fino a riempire lo stampo, si è inserito un pettine per la formazione dei pozzetti e si è lasciato polimerizzare. Infine è stato tolto con delicatezza il pettine e sono stati lavati i pozzetti con tampone di corsa TBE 1x. Sono stati caricati 18 μ L per ogni campione e con essi i marcatori di peso molecolare Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). E' stata quindi eseguita la corsa elettroforetica nel tampone di corsa nell'apparecchio per western blot protean III (Bio-Rad) a voltaggio costante (8-10 V/cm) per tre ore.

Il gel è stato in seguito incubato in una soluzione di TBE 1x (89 mM Tris base, 89 mM acido borico e 2 mM EDTA) e 70% di GelStar (LONZA); questo colorante si lega al DNA – per inserzione tra le basi appaiate (intercalazione) – e mostra un'intesa fluorescenza quando è illuminato da un fascio di luce ultravioletta.

Trascorso il tempo opportuno, si procede all'osservazione diretta del gel utilizzando una lampada a raggi ultravioletti, all'acquisizione dell'immagine al computer mediante GelDoc 1000 (Bio-Rad).

3.9 Saggio d'immunocitochimica per la rilevazione di HP1

L'Heterochromatin protein 1 o HP1 è una famiglia di proteine coinvolte nel silenziare geni mediante l'organizzazione della cromatina in strutture d'ordine superiore.

Narita e collaboratori dimostrarono che ogni SAHF contiene porzioni di un unico cromosoma condensato, che è impoverito per dell'istone H1 e arricchito dell'istone HP1. (Narita et al., 2003)

7×10^5 cellule sono state coltivate su vetrini ChamberSlide (Falcon BD, NJ, USA) dopo il silenziamento. In seguito fissate con 4% di formaldeide e permeabilizzate con metanolo. Il *blocking* è stato eseguito con 5% di siero per 60 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati incubati tutta la notte con l'anticorpo primario anti- α HP1 (1:400) (Millipore Italia, Italia).

In seguito, dopo opportuni lavaggi le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario di *goat-anti-rabbit* coniugato col FITCT (Jackson ImmunoResearch, UK) per 45 minuti a temperatura ambiente.

L'analisi e le acquisizioni delle immagini sono state compiute mediante l'utilizzo del software Leica F4000 System. Per ogni campione sono state analizzate 500 cellule; la

percentuale di nuclei positivi a H2A.X è stata calcolata dal rapporto tra i nuclei totali colorati con l'Hoechst e quelli positivi all'anticorpo anti-H2A.X.

Poiché la colorazione è visualizzata come puntini all'interno del nucleo i risultati sono stati divisi in tre gruppi: le cellule che non presentavano alcuna colorazione; cellule che presentavano colorazione inferiore a 10 puntini e cellule che presentarono colorazione superiore a 10 punti.

3.10 Saggio della nucleasi Micrococcica

La nucleasi micrococcica è una endo-nucleasi non specifica che digerisce gli acidi nucleici sia a singolo filamento che a doppio filamento in presenza di Ca^{2+} . Essa compie il taglio nelle regioni ricche di AT o AU generando mononucleotidi o oligonucleotidi con il 3' fosfato libero.

Per ogni saggio sono state prelevate 300.000 cellule. Le cellule sono state risospese in un buffer di permeabilizzazione così costituito: 0,1% di L- α -lisofosfatidilcolina (Sigma-Aldrich), in 150mM di saccarosio, 80mM KCL, 35mM Hepes pH 7,4, 5mM K_2HPO_4 , 5mM $MgCl_2$, 0,5 mM $CaCl_2$ per 90 sec. Trascorso il tempo opportuno, le cellule sono state centrifugate a 3000 rpm per 5-10 min a temperatura ambiente. Allontanato il supernatante è stato aggiunto il buffer di digestione: 2U/mL di nucleasi micrococcica (Sigma-Aldrich) in 20mM di saccarosio, 50mM Tris-HCL pH 7,5, 50nM NaCl e 2mM $CaCl_2$ incubato a temperatura ambiente a vari tempi.

Prima di procedere agli stadi successivi di purificazione del DNA, la nucleasi è stata inattivata aggiungendo 100 μ l di EDTA più 200 μ l di EGTA.

Al pellet è stato aggiunto 200 μ l di fenolo/cloroformio e centrifugato per 10 min a 5000 rpm. Prelevato il supernatante, è stato aggiunto 1 volume di cloroformio e centrifugato per 10 min a 5000 rpm. Il supernatante è stato messo in ghiaccio e il DNA è stato precipitato con 2,5 (v/v) di etanolo 100% (freddo), più NaCl a concentrazione finale di 0,3 M a -20° per tutta la notte. Il giorno successivo è stato centrifugato a massima velocità per 10 min. Il precipitato è stato lavato per due volte con etanolo freddo (Sigma) al 70%, poi seccato sotto lampada per evitare che permanessero tracce di alcool ed infine è stato risospeso in 20-30 μ l di H_2O bidistillata (mQ) trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma), che inattiva diverse Rnasi. La digestione del DNA è stata corsa mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

3.11 Saggio di proliferazione cellulare mediante incorporazione di BrdU

La BrdU è un nucleoside sintetico analogo della Timina, che viene incorporato nel DNA delle cellule che si trovano nella fase S del ciclo cellulare; tale molecola viene utilizzata per l'analisi della proliferazione cellulare *in vivo* ed *in vitro*.

7×10^5 cellule sono state coltivate su vetrini ChamberSlide (Falcon BD, NJ, USA) e incubate per 10 ore con 10mM BrdU (Sigma Aldrich, MO, USA).

Le cellule sono state lavate con PBS, fissate con metanolo al 100% a 4 °C per 10 minuti, successivamente essiccate all'aria, e poi incubate con HCl 2N per 60 min a 37 °C per permettere la denaturazione del DNA. L'HCl è stato neutralizzato con *buffer* borato (pH 8,5) 0,1 M.

Dopo successivi lavaggi con PBS, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo anti-BrdU di tipo monoclonale (clone BMC 9318, Roche, Germania). Dopo 60 minuti a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate con PBS e incubate con anticorpo secondario anti-mouse coniugato con perossidasi (Santacruz Biotech, CA, USA) per 30 minuti a temperatura ambiente. Il processo di rilevazione del segnale è stato eseguito mediante incubazione con perossidasi coniugata a streptavidina (Vector Laboratories) per 30 minuti, seguita da esposizione con 3,3'-diaminobenzitina (Vector Laboratories) per 2 minuti.

L'analisi e le acquisizioni delle immagini sono state eseguite mediante l'utilizzo del software Leica F1000 System.

Per ogni campione sono state analizzate 5000 cellule; la percentuale di nuclei positivi alla BrdU è stata calcolata dal rapporto tra i nuclei totali colorati con l'Hoechst e quelli positivi all'anticorpo anti-BrdU.

3.12 Saggio Unità Formanti colonie (CFU)

La capacità clonogenica delle cellule è definita come la capacità di formare colonie. Per questo motivo uno dei saggi essenziali per valutarne la funzionalità è il test Unità Formanti Colonia (CFU).

Le cellule del midollo osseo sono state estratte come descritto in precedenza. Il silenziamento per questo saggio è stato eseguito al passaggio 0. Le cellule sono state poi raccolte per il saggio come riportato da Pochampally (Pochampally, 2008).

In breve, le cellule sono state diluite nel terreno di coltura completo, e piastrate circa 1000 cellule per una piastra da 100-mm in terreno di coltura completo. Le cellule sono state incubate per 10-14 giorni a 37 °C al 5% di CO₂. In seguito sono state lavate con PBS e colorate con cristalvioletto 0,5% in metanolo per 5-10 minuti a temperatura ambiente. Le colonie sono state quindi lavate con PBS e poi contate.

3.13 Il trattamento con agenti che danneggiano il DNA

Le colture di MSC sono state trattate per 1 ora con 300 mM H₂O₂. Dopo il trattamento, il mezzo è stato rimosso, e sostituito con terreno completo. Le cellule sono state poi raccolte per l'analisi dei dati, 24 ore dopo.

Per le radiazioni UV, le piastre prive di coperchio sono state irradiate con luce UV da esposizione di una lampada germicida (sensibilità di picco di circa 254 nm) in una cappa coltura tissutale (15 mJ/cm²). Dopo il trattamento, il mezzo è stato rimosso, e sostituito con terreno completo. Le cellule sono state raccolte 24 ore dopo.

Per indurre il danno alla doppia elica del DNA, le cellule staminali mesenchimali sono state incubate per 6 ore con 1 mM doxorubicina. Dopo il trattamento, il mezzo è stato rimosso, e sostituito con terreno completo. Le cellule sono state poi raccolte per l'analisi dei dati, 24 ore dopo.

3.14 Saggio d'immunocitochimica per la rilevazione dell'8-oxo-dG

La 7,8-diidro-8-oxo-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG) rappresenta il prodotto più rappresentativo dei fenomeni di danno al DNA indotto dall'azione dei ROS intracellulari; il suo accumulo è utilizzato come marcatore dello stato patologico di stress ossidativo.

7x10⁵ cellule sono state coltivate su vetrini ChamberSlide (Falcon BD, NJ, USA) dopo il silenziamento. L'8oxodG presente nel DNA è stata rilevata mediante immunocitochimica con l'anticorpo primario anti-8oxodG (Trevigen, MD, USA), secondo il protocollo del produttore. In breve, le cellule sono state fissate in una soluzione 1:1 (v/v) di acetone e metanolo per 10 minuti a -20°C. In seguito essiccate all'aria e trattate con 0,05N di HCl per 5' su ghiaccio per permettere il denaturamento del DNA. Una volta reidratate sono state incubate con 100µg/ml RNase A (Fermentas) per 1 ora al fine di ottenere la

specificità della reazione solo per il DNA ossidato. In seguito le cellule sono state disidratate con soluzioni a concentrazione crescenti di etanolo per poterne permettere la colorazione del nucleo con il fluorescente Hoechst 333254 (Sigma-Aldrich). Le cellule sono state ridratate e incubate con Proteinasi K (Roche) per 15' a 37°C per rimuovere i legami crociati tra le proteine. In seguito incubate con una soluzione di *blocking* contenente 5% di *goat serum* (Jackson ImmunoResearch) per 1h a RT e poi con l'anticorpo primario anti-8-oxo-dG (Trevigen, monoclonal anti-mouse, dil. 1:250) a 4°C per tutta la notte.

Dopo i lavaggi, le sezioni sono state nuovamente incubate con anticorpo secondario coniugato con FITC (Jackson ImmunoResearch, anti-mouse, dil. 1:100). L'analisi e le acquisizioni delle immagini sono state compiute mediante l'utilizzo del software Leica F4000 System. Per ogni campione sono state analizzate 5 sezioni corrispondenti alla zona interessata dal trauma chirurgico; la percentuale di nuclei positivi all'8-oxo-dG presenti nella tunica intima e nella tunica media è stata calcolata dal rapporto tra i nuclei totali colorati con l'Hoechst e quelli positivi all'anticorpo anti-8-oxo-dG.

3.15 Saggio d'immunocitochimica per la rilevazione di H2A.X

La proteina H2A.X è una componente del core istonico dei nucleosomi. La fosforilazione di tale proteina (gamma/phospho H2A.X) rappresenta il primo "step" dei processi di reclutamento e localizzazione delle proteine coinvolte nei meccanismi di riparo del DNA (Kuo, Yang, 2008).

7x10⁵ cellule sono state coltivate su vetrini ChamberSlide (Falcon BD, NJ, USA) dopo il silenziamento. Dopo fissate con 4% di formaldeide e permeabilizzate con metanolo. Il *blocking* è stato eseguito con 5% di siero per 60 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati incubati tutta la notte con l'anticorpo primario anti-H2A.X (1:50) (Millipore Italia, Italia).

In seguito, dopo opportuni lavaggi le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario di *goat-anti-rabbit* coniugato col FITCT (Jackson ImmunoResearch, UK) per 45 minuti a temperatura ambiente.

L'analisi e le acquisizioni delle immagini sono state eseguite mediante l'utilizzo del software Leica F4000 System. Per ogni campione sono state analizzate 500 cellule; la

percentuale di nuclei positivi a H2A.X è stata calcolata dal rapporto tra i nuclei totali colorati con l'Hoechst e quelli positivi all'anticorpo anti-H2A.X.

Poiché la colorazione è visualizzata come puntini all'interno del nucleo i risultati sono stati divisi in tre gruppi: le cellule che non presentavano alcuna colorazione; cellule che presentavano colorazione inferiore a 10 puntini e cellule che presentarono colorazione superiore a 10 punti.

3.16 Saggio per la valutazione della capacità di riparo

Un tipo particolarmente pericoloso di danno al DNA per le cellule in divisione è la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica. Esistono due meccanismi capaci di riparare questo danno. Essi sono generalmente conosciuti come *Non-Homologous End-Joining* (saldatura delle estremità non omologhe) e *Homologous End-Joining* (ricombinazione omologa o riparazione per ricombinazione, o riparazione assistita da stampo). Questo saggio ha la capacità di mimare in vitro il *Non-Homologous End-Joining*.

Il test è stato effettuato sulla base di Diggle e collaboratori con alcune modifiche (Diggle et al., 2003). In breve, il plasmide pcDNA3 (Promega, Italia) è stato digerito con l'enzima di restrizione EcoRI (Invitrogen, Italia), purificato con fenolo ed etanolo e precipitato. Le MSC trasdotte sia con Ad-siBRG1 o Ad-siCTRL sono state lisate in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1M KCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT. I lisati proteici sono stati aggiunti al pcDNA3 digerito e purificato in un buffer di reazione che ha permesso al plasmide in vitro eventualmente di essere riparato, la reazione è avvenuta per 2 ore a 37 °C. La reazione è stata trattata con Proteinasi K e SDS per denaturare le proteine e quindi bloccare tutte le attività enzimatiche. I plasmidi sono stati purificati con fenolo e poi corsi su gel di agarosio.

3.17 Comet Assay

Il *comet assay* (*Single Cell Gel Electrophoresis* o SCGE) rappresenta un test di genotossicità di facile allestimento, rapida esecuzione ed elevata sensibilità. Inoltre richiede quantità ridotte di substrato ed è applicabile in vitro e in vivo a numerosi tipi di cellule e tessuti differenti; sono state preparate varianti del test per la rilevazione del danno ossidativo al DNA e per la rilevazione degli agenti in grado di indurre legami crociati DNA-DNA e DNA-proteine (*crosslinker*).

Il *comet assay* allestito per la rilevazione delle rotture del filamento del DNA prevede l'inglobamento delle cellule da esaminare in agarosio, i filamenti di DNA che non hanno subito rotture migrano scarsamente e tendono a rimanere concentrati in un nucleoide, mentre i frammenti generati da rotture del filamento migrano in proporzione inversa alla loro lunghezza e peso molecolare (Grandi et al., 2006).

Le cellule sono state preparate secondo il protocollo della Dott.ssa Dusinska (Dusinska, Collins, 2008). I vetrini portaoggetti sono stati precedentemente rivestiti con l'1% di Agarosio (GellyPhor^{LE}, EuroClone Italia) e lasciati asciugare tutta la notte a 4°C.

50x10⁶ cellule, in seguito ai trattamenti, sono state tripsinizzate e risospese in 700µL di agarosio low-melting (Sea Plaque GTG; FMC, Rockland, USA) per poi essere spalmate sul vetrino precedentemente trattato e poste a 4°C per 10 minuti. I vetrini sono stati poi immersi in una soluzione di lisi (2,5M NaCl, 0,1M EDTA 10mM Tris e 1% Triton-X100, pH10) e lasciati per 1 ora a 4°C. Successivamente i vetrini sono stati posti in una camera elettroforetica con un tampone alcalino (0.3M NaOH, 1mM EDTA) a 4°C e sottoposti ad un campo elettrico di 0,86 V/cm per 20 minuti. A seguire i vetrini sono stati neutralizzati con Tris 0,4 M, pH 7,5, e poi sciacquati con acqua. Il DNA è stato colorato con Hoechst 33342 per tutta la notte. I gel sono stati osservati attraverso un microscopio a fluorescenza (Leica Italia,). L'esame quantitativo delle code della comete è stato effettuato con un programma Quantity One image analysis (Biorad, CA, USA). Circa 500 cellule sono state analizzate per ogni campione.

3.18 Terreni per l'induzione adipo-, osteo- e condrogenica

Le cellule del midollo osseo sono state estratte come descritto sopra. Il silenziamento per questo saggio è stato eseguito al passaggio 0. Le cellule sono state poi raccolte per il saggio come riportato da Muraglia e collaboratori (Muraglia et al., 2000).

I cloni sono stati ottenuti con diluizioni limitanti. In breve, 10 cellule sono state piastrate in ciascun pozzetto di una piastra da 96 pozzetti in terreno completo. Sono state preparate 4 piastre per ogni tipo cellulare (RB, RB2, P107 e CTRL). Le culture sono state esaminate tutti i giorni per valutare l'eventuale comparsa di colonie. I pozzetti contenenti più di una colonia non sono stati considerati. Tutti i cloni che hanno raggiunto la confluenza sono stati tripsinizzati, e ciascuno ripiastrato in quattro pozzetti di una piastra con 24 pozzetti. Tre dei quattro pozzetti di ogni clone, sono stati utilizzati

per gli esperimenti di differenziamento quando le cellule raggiungevano la confluenza mentre uno è stato utilizzato come controllo indifferenziato.

3.18.1 Differenziamento Adipogenico

Le cellule sono state stimulate per 2 settimane in hMSC *Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza MD, USA).

- Oil Red: colorazione per la visualizzazione di adipociti

Le cellule sono fissate mediante 10% paraformaldeide (Sigma) a pH neutro, lavate e incubate per 1 ora con DPBS. Prima di aggiungere la soluzione colorante, si rimuove la paraformaldeide, si lavano le cellule con H₂O sterile, e si aggiunge isopropanolo al 60% (Sigma) per 5 minuti. La soluzione *Oil Red* è preparata aggiungendo al colorante, isopropanolo al 99%. In seguito è diluita 3:2 con H₂O deionizzata ed incubata per 5 minuti. Dopo aver eliminato l'eccesso di colorante con H₂O, si aggiunge ematossilina (Sigma) per 1 minuto, la quale è poi eliminata con acqua. Infine, è possibile visualizzare al microscopio ottico, in rosso i lipidi e in blu i nuclei.

3.18.2 Differenziamento Osteogenico

Le cellule sono state stimulate per 2 settimane in hMSC *Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza MD, USA).

- Alizarin Red: colorazione per la visualizzazione di osteociti

Il protocollo usato si basa su quello proposto da Stanford e collaboratori ([Stanford et al., 1995](#)). Le cellule sono dapprima fissate con 4% paraformaldeide (Sigma) per tutta la notte, poi lavate in PBS e colorate per 10 minuti con 40 mM della soluzione *Alizarin Red*, pH 4.2, a temperatura ambiente. Le cellule sono poi sciacquate con acqua per 5 volte, quindi si eseguono lavaggi in PBS per 15 minuti per eliminare il colore legato aspecificamente. Per visualizzare il colorante legato ai depositi minerali, si decolora ogni campione con sodio fosfato 10 mM contenente il 10% di cloruro di cetilpiridinio, pH 7, per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine si osservano al microscopio ottico.

3.18.3 Differenziamento Condrogenico

Le cellule sono state stimulate per 2 settimane in hMSC *Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium* (Lonza MD, USA).

- Blu di Toluidina : colorazione per la visualizzazione di condrociti

La soluzione di Blu di Toluidina, che contiene il colorante blu di toluidina (Sigma) disciolto in etanolo al 70%, permette di visualizzare le cellule in rosso porpora con un *background* blu. Dopo aver fissato le cellule con paraformaldeide (Sigma), si aggiunge la soluzione blu di Toluidina per 2-3 minuti; si sciacqua con acqua MQ e infine si visualizza al microscopio ottico.

3.19 Estrazione dell'RNA dalle cellule

L'estrazione dell'RNA dalle cellule è stata effettuata seguendo il metodo della guanidina isotiocianato proposto da P. Chomczynsky e collaboratori (Chomczynski et al, 1987). Tutti i passaggi di estrazione sono stati eseguiti con materiali monouso e sterili, privi di contaminazione con RNasi e DNasi. Dopo aver allontanato il mezzo di coltura, alle cellule è stato aggiunto 1 mL di OMIZOL (EuroClone, Italia) per piastra da 100 mm. Il campione è stato quindi omogenato mediante una siringa da 1 mL, raccolto e trasferito in un tubo Eppendorf da 1,5mL e incubato a 4°C per 5 minuti per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Dopo aver aggiunto 100 µL di Bromo-cloro-propano (Sigma), la miscela è stata agitata vigorosamente per 15 secondi e lasciata a temperatura ambiente per 10 minuti. Il bromo-cloro-propano è meno tossico del cloroformio e riduce la possibilità di contaminazione di RNA con DNA. Il campione è stato centrifugato a 13000 rpm (centrifuga Eppendorf mod. 5415R, rotore F45-24-11) per 15 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione la miscela si separa in una fase inferiore rossa (fase fenolo/bromo-cloro-propano), un'interfase fioccosa e una fase acquosa superiore. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa, mentre DNA e proteine sono nell'interfase e nella fase inferiore. Al supernatante, recuperato delicatamente, è stato aggiunto un volume di 500 µL di isopropanolo freddo (Sigma), la soluzione risultante è stata quindi incubata a -20°C per 30 minuti ed infine centrifugata a 13000 rpm per 8 minuti a 4°C per far precipitare l'RNA. Il precipitato è stato lavato per due volte con etanolo freddo al 70%, poi seccato sotto una lampada per evitare che permanessero tracce di alcool e infine il campione risospeso in 50 µL di H₂O mQ DEPC (Sigma), che inattiva le Rnasi. La soluzione è stata sottoposta a digestione per 30 minuti

a 37°C aggiungendo 1 µl di Dnasi I (2 unità/µl) (Ambion) e 0,1 volumi di tampone DNasi I 10x fornito dal Kit (DNA-free™, Ambion). Per eliminare la DNasi ed il DNA degradato sono stati eseguiti i seguenti passaggi: è stato aggiunto 0,1 volumi di reagente disattivante della Dnasi I (DNA-free™, Ambion) ed incubato per 2 min a temperatura ambiente; la soluzione è stata quindi centrifugata a 10000 x g per 1 minuto al fine di precipitare il reagente inattivante; il supernatante, prelevato delicatamente, è stato posto in una nuova provetta. L'RNA è stato quantizzato spettrofotometricamente. Il campione è stato diluito 200 volte in H₂O trattata con DEPC e ne è stata determinata la concentrazione in base al valore dell'assorbanza letta a 260 nm. La concentrazione è stata determinata, moltiplicando il valore di densità ottica ottenuto per il fattore di diluizione. Si utilizza poi la relazione matematica 25 OD = 1 mg/ml di RNA.

3.20 Analisi dell'mRNA mediante RT-PCR semiquantitativa

L'analisi dei livelli di mRNA dei geni di interesse è stata effettuata mediante RT-PCR, seguendo un protocollo opportunamente ottimizzato.

La PCR (*polimerase chain reaction*) ha rivoluzionato la sperimentazione volta a risolvere problemi legati alla struttura e alla sequenza del DNA e ha permesso di affrontare questioni che vanno dall'identificazione di nuovi geni fino alla quantificazione di sequenze nucleotidiche specifiche.

Il frammento che si vuole amplificare è riconosciuto, ai suoi estremi, da due corti segmenti di DNA, i cosiddetti *primers* o inneschi, oligonucleotidi di 20mer complementari alle sequenze di basi che fiancheggiano il frammento. I *primers* avviano la polimerizzazione da parte della Taq polimerasi; in ciascuno dei primi cicli di polimerizzazione, il numero di copie della sequenza bersaglio raddoppia, mentre in seguito la reazione perde il carattere di esponenzialità fino a raggiungere una fase di *plateau*. Studi di cinetica della reazione hanno permesso di determinare che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, con 29 – 32 cicli, la reazione di amplificazione (il numero varia in funzione dei tratti genici da amplificare) non raggiunge la fase di *plateau*. Questo dato è di fondamentale importanza per garantire delle quantificazioni attendibili; infatti, un'eventuale saturazione della reazione di amplificazione non permetterebbe di apprezzare le differenze quantitative fra i campioni. La tecnica di RT-PCR semiquantitativa, opportunamente ottimizzata, consente di ottenere indicazioni sui

livelli di espressione di geni di interesse, misurando l'abbondanza degli mRNA trascritti da questi geni. Ciò non significa che è stata calcolata la quantità assoluta di messaggio presente, bensì sono state determinate le variazioni del grado di espressione del gene, confrontando i livelli di mRNA specifico amplificato nelle cellule staminali stromali di midollo osseo da paziente con RTT con quelli dello stesso mRNA amplificato nelle cellule di controllo.

400 ng di RNA sono stati retrotrascritti in cDNA in 25 µL di una soluzione contenente 32 ng/mL di una miscela di oligo esameri a sequenza casuale (Amersham), 800 µM di una miscela di dNTP (Finnzyme), 24 U di rRNasin (Promega), tampone 1X per la trascrittasi inversa (Finnzyme) e 1U di trascrittasi inversa da M-MuLV(Finnsyme).

L'RNA è stato preincubato con gli esameri e l'H₂O per 10 min a 65°C, poi è stato raffreddato in ghiaccio per 5 minuti e, dopo l'aggiunta della trascrittasi inversa, del buffer e dei dNTP, incubato per un'ora a 42°C. In seguito 1-3 µl del prodotto della retrotrascrizione (la quantità dipende dal messaggio da amplificare) sono stati utilizzati per la successiva amplificazione; la miscela di reazione conteneva, in un volume finale di 25 µl, tampone 1X (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 100 µM dNTP, 600 nM di ognuno dei due opportuni primers e 0,75 U dell'enzima Taq polimerasi (Promega).

La reazione di amplificazione, effettuata con un apparecchio per PCR (Gene Amp 9700 Perkin Elmer), ha seguito il seguente protocollo: il primo passo della reazione di amplificazione prevede la denaturazione del DNA a 94°C per 3 minuti.

A esso seguono 29 – 32 cicli che prevedono:

- Denaturazione del DNA a 94°C per 45 secondi
- Annealing tra DNA stampo e *primers* per 45 secondi, la temperatura dipende dai differenti primers utilizzati
- Elongazione dell'amplicone a 72°C per 45 secondi

In ciascun esperimento di RT-PCR sono stati eseguiti controlli negativi. I controlli negativi (che servono per dimostrare che il prodotto di amplificazione non provenga da contaminazione di DNA nell'RNA di partenza né sia il frutto di una contaminazione da parte dell'operatore) sono stati effettuati sia sottoponendo a trascrizione inversa un campione contenente tutti i reagenti della reazione, ad eccezione dell'enzima della retrotrascrizione (controllo negativo della RT), sia amplificando un campione contenente tutti i reagenti della PCR tranne il cDNA (controllo negativo della PCR). I *primers* sono stati scelti mediante il software OLIGO 4.05 (W. Rychlik copyright, 1992) basandosi sulle

sequenze di mRNA di GeneBank (DNASTAR Company). Tutti i *primers* utilizzati hanno una lunghezza di 20-22 nucleotidi e contengono una percentuale in G-C compresa fra il 50 ed il 60%. La sequenza dei *primers* è riportata in tabella 1.

Ogni campione è stato amplificato in triplicato, 12 μ l di ogni amplificazione sono stati poi caricati su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante il "Gel Doc 1000 UV *fluorescent gel documentation system* (BIO-RAD). I campioni di DNA da caricare sul gel sono stati "appesantiti" con una soluzione contenente 5% glicerolo e Blu di bromofenolo all'0,084%. La dimensione dei prodotti di amplificazione è stata determinata mediante il confronto con il marcatore di peso molecolare Ladder 100 (M-Medical), che presenta bande di DNA di dimensione multipla di 100 bp. L'analisi densitometrica semiquantitativa è stata condotta utilizzando il software Molecular Analyst (Bio-Rad).

Per rendere i risultati indipendenti da eventuali errori nella quantificazione e dal grado di purezza dell'RNA totale di partenza, in ogni esperimento l'amplificazione dei messaggi di interesse è stata accompagnata dall'amplificazione dell'mRNA del gene per l'ipoxantina fosforibosiltrasferasi (HPRT). Le variazioni dei livelli dell'mRNA sono state calcolate normalizzando i valori rispetto a questo controllo interno. La scelta è caduta su questo gene *housekeeping*, poiché si ritiene che il suo livello di espressione rimanga stabile nei processi studiati.

Tabella 1

Nome	Posizione	Sequenza	bp	Ta	Nome	Posizione	Sequenza	bp	Ta
P16	118	5'-TTCCTGGACAGCTGGTGGT-3'	158	64	SOX2	627	5'-ACAACCTCGGAGATCAGCAAGC-3'	162	61
	275	5'-TGGTTACTGCCACTGGTGCC-3'				788	5'-TCATGAGCGTCTTGTTTTCC-3'		
P21	632	5'-CAAAGGCCCGCTCTACATCTT-3'	171	57	NANOG	1169	5'-TGGACACTGGCTGAATCCTTC-3'	142	59
	802	5'-AGGAACCTCTCATTACCCGA-3'				1310	5'-CGCTGATTAGGCTCCAACCAT-3'		
P27	913	5'-GGAATAAGGAAGCGACCTGCA-3'	107	58	BMI1	437	5'-ATTGTCTTTCCGCCGCT-3'	139	59
	1019	5'-TCCACAGAACCGGCATTTG-3'				575	5'-ACCTCCACAAAGCACACACAT-5'		
P53	1892	5'-TGGCCTTGAACCACCTTTT-3'	101	59	TCL1	667	5'-CTCGGCTTTTCTCAGCTGGAT-3'	127	59
	1992	5'-AACTACCAACCACCAGCCAA-3'				793	5'-GGTGAATCGGCTGTGTCTCA-3'		
RB	2443	5'-TTGCAGTATGCTCCACCAGG-3'	107	59	GDF3	778	5'-AAAAGGAGAGCAGCCATCCCT-3'	110	60
	2549	5'-ATGTTCCCTCCAGGAATCCGT-3'				887	5'-GCAATGATCCACTTGTGCCAA-3'		
RB2/P130	3958	5'-TGACAAAGGAGAGCACACCCA-3'	134	60	ZFP42	953	5'-ATGACAGTCTGAGCGCAATCG-3'	133	60
	4091	5'-TGCACACCCGAACAATCAAG-3'				1085	5'-AACGTTTCCCACATTCCG-3'		
P107	2949	5'-TGATGGATGCTCCACCCTCT-3'	128	59	DPPA2	798	5'-AGCCATGTTGGCATCATGG-3'	108	58
	3073	5'-TGGTGAAGGCCTGACCCATT-3'				905	5'-GAGGCTTGCATCAAAAAGGC-3'		
BRG1	1718	5'-AGCATGCCAAGGATTTCAAGG-3'	126	60	OCT3/4	1121	5'-TCCCAGTCATTCAAACTGAGG-3'	103	60
	1843	5'-CGATCCGCTCGTTCTCTTTTCT-3'				1223	5'-CCAAAAACCTGGCACAAACT-3'		
HPRT	98	5'-AGCCCTGGCGTCTGATTA-3'	167	57	SOX15	315	5'-GAACAGGTTGAAGCAAAGGC-3'	127	80
	264	5'-TGGCCTCCCATCTCTTCA-3'				441	5'-GCGTCGATCCTGAAATGGA-3'		
GAPDH	121	5'-GGAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	161	58	ERAS	969	5'-AATGTAGACCTTTCCCCAGGC-3'	135	58
	281	5'-ACGGTGCCATGGAATTTGC-3'				1103	5'-AAAGCCCTCACCAAGTGAA-3'		
BAX	227	5'-ATGCGTCCACCAAGAAGCTGA-3'	131	61	KLF4	1508	5'-CTGCGGCAAAACCTACACAA-3'	182	60
	357	5'-TGCCACTCGGAAAAAGACCTC-3'				1689	5'-GGTCGATTTTTGGCACTG-3'		
BCL2	4414	5'-GCTGCACAAATACTCCGCCAAG-3'	182	58	UTF1	876	5'-CGACATCGCGAACATCCTG-3'	117	64
	4595	5'-TGTGGAGAGAATGTTGGCGTC-3'				992	5'-AGAATGAAGCCACGGCCA-3'		
ARF	415	5'-GCCCTCGTCTGATGCTAC-3'	78	61	SALL4	2394	5'-GCCAGATATCCTGGAAACCA-3'	115	60
	492	5'-CCCATCATCATGACCTGGTCT-5'				2508	5'-TTCTCGGAGCTCTGTCTTTG-3'		
CYC E	268	5'-AGGAAGAGGAAGGCAAACGTG-3'	114	59	OSTEOPONTIN	463	5'-GGTCACTGATTTCCACGGA-3'	144	59
	381	5'-TGCATTATTGCCAAAGGCTG-3'				606	5'-TGGATGTCAGGTCTGCGAAAC-3'		
MDM2	286	5'-GGAGCAGGCAAATGTGCAA-3'	111	59	AGGRECAN	6427	5'-TCCTCAAGCCTCCTGTACTCAG-3'	102	59
	396	5'-GCAATGGCTTTGGTCTAACCA-3'				6528	5'-TTCACGTTTCCATTCCGGA-3'		
TERT	1682	5'-AAGTTCCTGCACTGGCTGATG-3'	136	57	PPAR-gamma	844	5'-TCGACCAGTCAATCCAGAGT-3'	102	59
	1813	5'-GCTTTGCAACTTGCTCCAGAC-3'				945	5'-TCGCCTTTGCTTTGGTCAG-3'		
MUTYH	1601	5'-TGACGCAGGAGGAATTCACA-3'	101	60	FEN1	464	5'-TGCCATTGATGCCTCTATGA-3'	127	60
	1701	5'-TTTGGAACCCATACAGTCCC-3'				590	5'-CGAATGGTGGGTAGAACATG-3'		

Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

PRKDC	3141 3242	5'-TTGTGGTCGGGTATTTCGAGAA-3' 5'-CGCTTGAAAAGCGATTTGGT-3'	102	57	NTLH1	331 443	5'-CAAAAAGGATGCACCTGTGGA-3' 5'-TTTGGCTGGAGAGCATCAGTG-3'	113	61
MLH1	1517 1634	5'-CCCGAAAGGAAATGACTGCA-3' 5'-AACATCTCCCGGAGAACCTCA-3'	118	58	ERCC3	1222 1324	5'-CCCAGTTCAAGATGTGGTCCA-3' 5'-TAGGTGCTAATGGCAACGGAG-3'	103	61
MBD4	384 487	5'-GCTTCTGCTCAGTTTGGTGCT-3' 5'-CCTGCTGTCTCCCAAATAACC-3'	104	58	RAD23A	146 255	5'-CAGACCTTCAAGATCCGCATG-3' 5'-ATGAGTTTCTGTCCAGCCACG-3'	110	60
OGG1	2074 2180	5'-CATATGTGGCACATTGCCCA-3' 5'-CTCCGAAAAAGTTTCCAGTT-3'	107	61	BRCA2	3732 3884	5'-AATGCCCATCGATTGGTC-3' 5'-AAAGCCCCTAAACCCCACTTC-3'	153	56
MPG	341 479	5'-CAGCATCTATTTCTCAAGCCCA-3' 5'-TCGGAGTTCTGTGCCATTAGG-3'	139	61	POLD3	178 305	5'CAGTGTCTGTACGGAACCAA-3' 5'-CTCGCTTCCCCCTTTTTTTT-3'	128	58
XPA	738 873	5'-GAATTGCGGCGAGCAGTAA-3' 5'-ATGTCAGTTCATGGCCACACA-3'	136	57	MRE11A	675 775	5'-GGCAATCATGACGATCCCA-3' 5'-TCCACAGACATTGAACGTCCA-3'	101	57
SLK	2607 2713	5'-AAATTTCCGGCGCTTTGAG-3' 5'-TTCCAGGCGTTCGATAGTCTG-3'	107	56	TREX1	1195 1305	5'-ACACAATGGTGACCGTACGA-3' 5'-TTCAGCGCAGTGATGCTATCC-3'	111	61
MSH2	2058 2160	5'-TTCCACATCATTACTGGCCCC-3' 5'-CACATGGCACAAAACACCCA-3'	103	57	MSH5	2353 2454	5'-GCCACCACTTTCTGAGCCTT-3' 5'-GACAAGATCGTTGCCATCCTC-3'	102	60
XRCC4	781 881	5'-TTCTGAAATGACTGCTGACCGA-3' 5'-TTACAGCAGCTGAAGCCAACC-3'	101	57					

bp= lunghezza dell'amplicone espressa in coppie di basi (bp)

Ta = temperatura di annealing espressa in gradi centigradi.

3.21 Preparazione di un gel di agarosio

Le tecniche di elettroforesi su gel di agarosio rappresentano un valido strumento di analisi per gli acidi nucleici poiché permettono di separare molecole di diverso peso molecolare originariamente presenti in una miscela.

In sostanza, un gel può essere definito come una rete molecolare attraverso le cui maglie migrano le macromolecole sotto l'azione di un campo elettrico, in maniera inversamente proporzionale al peso molecolare. Terminata la corsa elettroforetica è possibile visualizzare i frammenti. I gel di agarosio sono stati preparati utilizzando il GelStar (LONZA), questo colorante si lega al DNA per inserzione tra le basi appaiate (intercalazione), e mostra un'intensa fluorescenza quando è illuminato da un fascio di luce ultravioletta. Per preparare un gel per DNA, l'agarosio è sciolto a 100°C su una piastra riscaldata, in tampone TAE (40 mM Tris-Acetato, 2 mM EDTA). La soluzione, al 2% peso/volume, è fatta raffreddare a temperatura ambiente fino a circa 40-45°C; si aggiunge, a questo punto, il GelStar ad una concentrazione finale di 0.1 µL/mL. La soluzione è poi versata in un apposito stampo, in cui è inserito un pettine per la formazione dei pozzetti; si lascia, infine, solidificare il gel. Le corse elettroforetiche sono condotte a temperatura ambiente in una camera elettroforetica (Bio-Rad) in tampone di corsa (TAE). Nei pozzetti del gel d'agarosio sono caricati, oltre ai campioni di DNA sottoposti all'analisi per PCR, miscele di frammenti di DNA a doppia elica di lunghezza nota (marcatori di peso molecolare). Al termine della corsa elettroforetica si procede all'osservazione diretta del gel utilizzando una lampada a raggi ultravioletti, all'acquisizione dell'immagine al computer mediante GelDoc 1000 (Bio-Rad) e alla quantificazione delle bande di DNA con il software Quantity One (Bio-Rad).

3.22 Lisati cellulari per estrazione di proteine

Una volta allontanato il terreno di coltura dalle cellule si procede a 2 lavaggi rapidi con PBS 1X. A questo punto sono stati aggiunti 100 µL di tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA pH 8, 250 mM NaCl (Serva), 50 mM NaF (Sigma), 0.1% Triton X-100 (Bio-Rad), 0.1 mM Na₃VO₄ (Sigma) direttamente su ogni piastra poggiata su ghiaccio. Al tampone sono stati, inoltre, aggiunti gli inibitori delle proteasi: 1mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoride) (Boehringer) e 1 µM leupeptina (Boehringer). Mediante l'uso di un *cell scraper*, si è distribuito in maniera uniforme il buffer di lisi e il lisato è stato

raccolto all'interno di un tubo Eppendorf da 1,5 mL. Il lisato è stato lasciato 30 minuti in ghiaccio e poi centrifugato alla massima velocità per 60 secondi a 4°C (centrifuga Eppendorf mod. 5415R, rotore F45-24-11). Infine il supernatante è stato raccolto ed è stata determinata la concentrazione proteica con il metodo Bradford utilizzando il kit *Bio Rad Protein Assay* (Bio Rad), seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Questo saggio si basa sul cambio di colore del *Coomassie Brilliant Blue G-250* in risposta a diverse quantità di proteine. La lettura della concentrazione proteica avviene allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. La determinazione della concentrazione proteica è preceduta dalla costruzione di una retta di taratura ottenuta dalle letture di soluzioni proteiche a concentrazione nota. Per tale retta sono lette 7,5 µg, 15 µg, 30 µg di BSA in 3 mL di Bio Rad Protein Assay diluito 1:5 in H₂O bidistillata. Ottenuta la retta di taratura (che riporta la quantità di BSA in funzione dell'assorbanza) si possono calcolare i valori di concentrazione dei lisati proteici incogniti letti allo spettrofotometro in 3 ml di Bio Rad Protein Assay diluito 1:5 in H₂O bidistillata.

3.23 Western blot

3.23.1 Preparazione di mini-gel di poliacrilammide denaturanti

Attraverso Western Blot, le proteine dei lisati sono separate su gel di poliacrilammide, trasferite su filtro e poi identificate per interazione con anticorpi marcati.

L'agente denaturante utilizzato nei gel per le proteine è stato il dodecilsolfato di sodio (SDS) che è un detergente anionico in grado di legarsi saldamente alle proteine causandone la denaturazione e determinando l'acquisizione di una carica negativa. Inoltre, per incrementare la risoluzione delle bande proteiche, i campioni, prima di entrare nel gel di separazione, attraversano un gel impaccatore. La diversa composizione e il diverso pH esistenti tra questi due gel fanno in modo che il campione si concentri in una stretta banda prima di venir risolto durante la migrazione nel gel principale.

Per la preparazione del gel di separazione al 10% è stato seguito il seguente protocollo: 10% Acrisis (Bio-Rad), 0.4 M Tris/HCl pH 8.8 (Bio-Rad), 0.1% SDS (Serva), 0.5% TEMED (Bio-Rad), 0.12% Ammonio Persolfato (Baker). La soluzione è stata versata nell'apposito stampo, formato da due lastre di vetro separate da due spaziatori di spessore 1 mm, riempendone circa i 2/3; si è atteso quindi che il gel polimerizzasse.

Dopo questa fase, è stato preparato il gel impaccatore: 5% Acrisis, 0.12 M Tris/HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.5% TEMED, 0.12% Ammonio Persolfato. E' stato quindi versato il gel separatore fino a riempire lo stampo, si è inserito un pettine per la formazione dei pozzetti e si è lasciato polimerizzare. Infine è stato tolto con delicatezza il pettine e sono stati lavati i pozzetti con tampone di corsa: 25 mM Tris (Sigma), 250 mM glicina (Sigma), 0.1% SDS, pH 8.5. Sono stati caricati 30 µg per ogni lisato cellulare e con essi i marcatori di peso molecolare Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). E' stata quindi compiuta la corsa elettroforetica nel tampone di corsa nell'apparecchio per western blot protean III (Bio-Rad) a voltaggio costante per circa 1 ora.

3.23.2 Trasferimento su filtro

Le proteine separate su gel denaturante di poliacrilammide al 10% sono state trasferite su di un filtro di polivinilidene-difluoruro (PVDF) (Hybond-C, Amersham). Il filtro è stato preliminarmente attivato in metanolo per 10 secondi, lavato per cinque minuti in H₂O bidistillata e posto per 10 minuti nel tampone di trasferimento: 48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanolo (Carlo Erba) pH 8.3. Il filtro è quindi stato posto a stretto contatto con il gel disponendo al suo esterno tre foglietti di carta 3MM (Whatman). Il filtro e il gel sono stati posti tra due spugnette anch'esse idratate in tampone di trasferimento. Il trasferimento è stato compiuto in una camera elettroforetica Trans-Blot (Bio-Rad) a 100 V (200 mA) per 1 ora nel tampone di trasferimento a 4°C.

3.23.3 Ibridazione del filtro

Dopo il trasferimento, il filtro è stato lavato in T-TBS 0,05%: TBS 1X pH 7.5 (20 mM Tris, 500 mM NaCl), 0,05% Tween-20 (Bio-Rad) è quindi stato saturato mediante incubazione per un'ora su agitatore nella soluzione di blocking: 5% latte in polvere non grasso (Bio-Rad) in T-TBS 0,05%. Il filtro è stato poi incubato per tutta la notte a 4°C su agitatore con l'anticorpo primario opportuno (Sigma), diluito 1:300, in T-TBS 0,05% con 3% di latte in polvere non grasso.

In seguito il filtro è stato lavato con T-TBS 0,05% cinque volte per 5 minuti, sempre sotto costante agitazione. È stato dunque aggiunto per 1 ora l'anticorpo secondario opportuno coniugato con la perossidasi di rafano (Amersham), diluito 1:1000 in T-TBS 0,05%. Infine il filtro è stato lavato per tre volte con T-TBS 0,05%.

3.23.4 Rivelazione dell'anticorpo

Il filtro è stato incubato a temperatura ambiente per 5 minuti con le soluzioni di rivelazione *ECL Advance Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences) seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. L'*ECL Advance Western Blotting Detection Kit* si basa sull'emissione di luce da parte di un substrato, il luminolo, quando viene ossidato dall'enzima; questa emissione di luce impressiona una lastra fotografica che viene poi analizzata al densitometro GelDoc 1000. La rivelazione è eseguita esponendo il filtro, avvolto in *Saran Wrap*, a lastre fotografiche Kodak per 2 minuti.

I risultati sono stati normalizzati utilizzando come controllo interno la α -tubulina, la cui presenza è stata rilevata con un anticorpo monoclonale anti- α -tubulina (Sigma) seguendo il protocollo appena descritto.

3.24 Analisi Statistiche

I valori statistici sono stati valutati usando l'analisi ANOVA seguita dal test t di Student e dal test Bonferroni. I valori sono stati espressi con il valore medio \pm la deviazione standard.

5. Risultati

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

4.1 BRG1

4.1.1 KnockDown di BRG1.

Le cellule staminali mesenchimali sono state sottoposte ai diversi esperimenti dopo 48 ore dalla trasduzione con shBRG1. Si è ottenuto circa l'80-90% di trasduzione con 100 MOI virali per cellula. Tra i diversi siRNA testati per il knockdown di BRG1 quello nominato sh2045 è quello che è risultato più efficace, poiché riduce di circa il 70% sia i livelli di mRNA che quelli della proteina (Figura 8). I livelli di mRNA sono stati normalizzati rispetto a quelli di HPRT e di GAPDH, entrambi geni *housekeeping*. Al contrario i livelli di proteina sono stati normalizzati sul totale di proteine caricate.

4.1.2 Il silenziamento di BRG1 non mostra alcun effetto sulla progressione del ciclo cellulare mentre riduce l'apoptosi.

La downregolazione di BRG1 non ha alcun effetto sulla progressione del ciclo cellulare come dimostrato dall'analisi al citofluorimetro. In diversi esperimenti non si è evidenziata alcuna modifica significativa della percentuale di cellule in fase G1, in fase S e in fase G2/M rispetto al controllo (Figura 9).

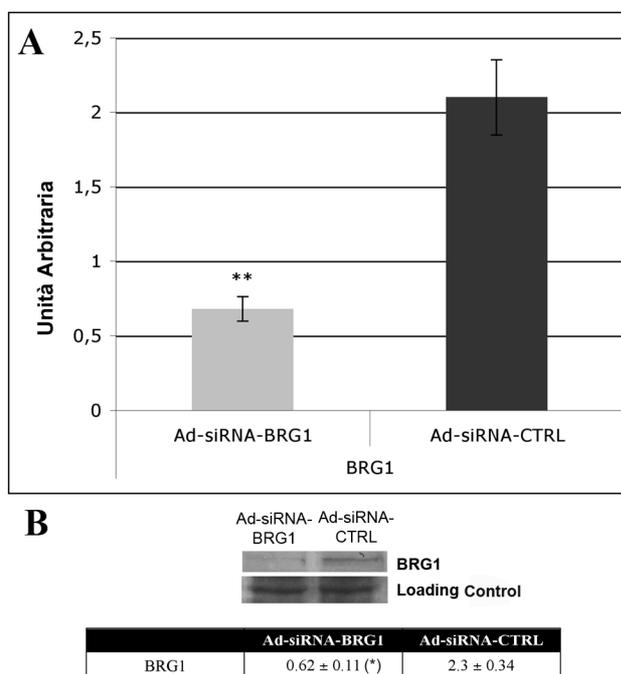
Al contempo il saggio dell'annessina ha evidenziato una notevole riduzione di cellule apoptotiche, dove BRG1 è stato silenziato rispetto al controllo. Questo risultato non è associato ad una modifica della caspasi 9 e ciò suggerisce, che la riduzione dell'apoptosi potrebbe essere indipendente dalla via che prevede l'attivazione del citocromo c/Apaf-1/caspase 9, come invece è dimostrato in altri sistemi cellulari (Figura 9) ([Napolitano et al., 2007](#)).

4.1.3 Il silenziamento di BRG1 promuove la senescenza e ha effetti sulle proprietà staminali delle MSC.

Il saggio della beta-galattosidase ha dimostrato un notevole aumento della positività delle cellule, quando queste venivano trattate con sh2045 rispetto ai controlli (Figura 10). In accordo a questo dato è la riduzione dell'attività della telomerasi, come dimostrato dal saggio TRAP (Figura 10) e la riduzione della potenzialità delle cellule di formare colonie come dimostrato dal saggio CFU.

Per rafforzare questi risultati si è deciso di concentrare l'attenzione sull'espressione di quei geni coinvolti nelle proprietà staminali. Lavori già presenti in letteratura, hanno

Figura 8



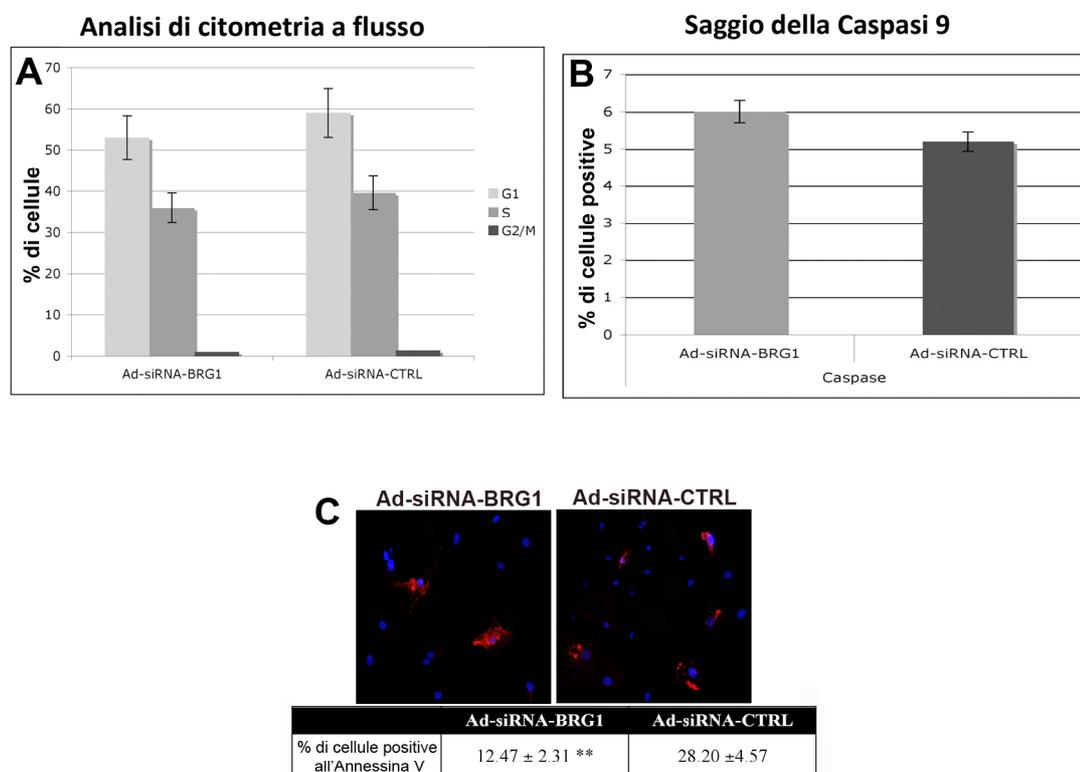
Il silenziamento di BRG1.

A: I livelli di mRNA sono stati normalizzati rispetto alla HPRT e GAPDH scelto come controlli interni. L'istogramma mostra la media dei valori d'espressione (\pm SD, n = 3).

La variazione del mRNA delle cellule trattate con Ad-siRNA-BRG1 è stato confrontato con le cellule trasdotte con Ad-siRNA-CTRL, scelto come riferimento (** p < 0,01).

B: Western blot dei livelli di BRG1 in MSC trattate con Ad-siRNA-BRG1 e Ad-siRNA-CTRL, rispettivamente. I livelli della proteina sono stati normalizzati rispetto al totale delle proteine caricate. La tabella mostra la media dei valori d'espressione (\pm SD, n = 3) (* p < 0,05).

Figura 9



Gli effetti del silenziamento BRG1 sul ciclo cellulare e apoptosi.

A: L'istogramma mostra i risultati (\pm SD, n = 3) dell'analisi della citometria a flusso delle cellule staminali mesenchimali trasdotte con Ad-siRNA-BRG1 e CTRL.

B: L'istogramma mostra i livelli d'attività della caspasi 9 in MSCs trattate con Ad-siRNA-BRG1 e Ad-siRNA-CTRL, rispettivamente.

C: La microfotografia a fluorescenza rappresenta, cellule colorate con l'annessina V (rosso), la quale si lega ai residui di fosfatidilserina esposta sulla superficie esterna delle membrane cellulari durante le prime fasi dell'apoptosi. I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342 (blu). La tabella mostra la media dei valori di espressione (\pm SD, n = 3).

Figura 10

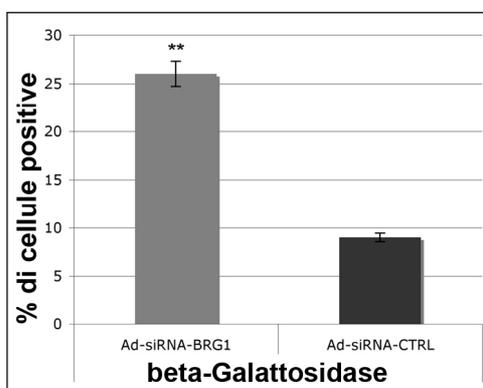
A

Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari



B

GENE	Ad-siRNA-BRG1	Ad-siRNA-CTRL
<i>SOX2</i>	n.d.	n.d.
<i>OCT3</i>	0.75 ± 0.13	0.96 ± 0.18
<i>NANOG</i>	n.d.	0.78 ± 0.15
<i>SOX15</i>	0.55 ± 0.09	0.69 ± 0.13
<i>BMI1</i>	1.50 ± 0.19	1.04 ± 0.11
<i>ERAS</i>	n.d.	n.d.
<i>TCL1</i>	n.d.	n.d.
<i>KLF4</i>	1.20 ± 0.16	1.39 ± 0.17
<i>GDF3</i>	n.d.	n.d.
<i>SALL4</i>	0.87 ± 0.13	0.97 ± 0.17
<i>ZFP42</i>	n.d.	n.d.
<i>UTF1</i>	n.d.	n.d.
<i>DPPA2</i>	n.d.	n.d.
<i>TERT</i>	n.d.	3.44 ± 0.37

Gli effetti del silenziamento BRG1 sulla senescenza cellulare.

A: L'istogramma mostra la percentuale di cellule senescenti (\pm SD, n = 3; ** p < 0,01).

B: Nella tabella sono riportati i livelli di mRNA dei geni associati alla staminalità analizzati con RT-PCR. La variazione dell'mRNA delle cellule trattate con AdsiRNA-BRG1 è stato confrontato con le cellule trasdotte con Ad-siRNA-CTRL, (** p < 0,01). n.d. significa "non rilevato".

dimostrato, che alcuni geni partecipano alla proprietà staminali come l'abilità self-renewal e lo stato uncommitted. Inizialmente questi geni sono stati identificati nelle cellule ES, mentre nelle cellule adulte essi sono poco o per nulla espressi (Mikkers, Frisen, 2005, Takahashi, Yamanaka, 2006). Si è quindi deciso di analizzare alcuni geni presenti nelle ES per valutare quali di questi fossero ancora espressi nelle cellule staminali mesenchimali. Non si è osservato alcuna espressione dei geni SOX2, GDF3, e ZFP42. Per un altro gruppo di geni, quali BMI1, UTF1, TCL1, DPPA2 ed ERAS l'espressione

era così bassa, che è stato impossibile quantificarla. Per un terzo gruppo di geni è stato possibile ottenere una riproducibilità mediante analisi con RT-PCR. In particolare si è ottenuta l'espressione dei geni OCT3, NANOG e KLF4, che sono d'altronde geni chiave del core trascrizionale per la regolazione delle proprietà staminali nelle (Masui et al., 2007, Matoba et al., 2006). Interessante è stata la scomparsa completa del gene NANOG in cellule trattate con sh2045 rispetto al controllo (Figura 10). Nelle MSC sono stati evidenziati, inoltre, bassi livelli di geni tessuto-specifici. E' da ricordare, che durante il differenziamento, la formazione di eterocromatina evita la promiscuità dei trascritti e limita l'attività di geni tessuto-specifici. In accordo con quanto detto, si potrebbe ipotizzare che il differenziamento delle MSC è basato sulla regolazione di quei geni, che sono già espressi nelle cellule indifferenziate.

La modifica dell'espressione dei geni della staminalità potrebbe associarsi con un'alterazione dell'espressione di geni tessuto-specifici, pertanto è sembrato opportuno analizzare i markers del differenziamento canonico delle MSC in adipociti, osteociti e condrociti. Nelle cellule trattate con sh2045 si è riscontrata la riduzione del $61\pm 12\%$ di *PPAR-gamma*, marcatore del differenziamento adipocitario. Non si sono osservate al contempo modifiche nell'espressione dei geni di *aggreca*n e *osteopontin* marcatori del differenziamento condrocitario e osteocitario rispettivamente.

4.1.4 La senescenza è associata con cambi nello stato cromatinico.

Si è pertanto deciso di analizzare se la senescenza indotta dal knockdown di BRG1 si associasse con cambi nell'organizzazione della cromatina, in conseguenza della capacità dei rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti di alterare il contatto tra gli istoni e modificarne la struttura.

Per valutare lo stato dell'eterocromatina presente nelle MSC trasdotte con siBRG1 mi sono avvalso di due saggi: La digestione del DNA con Nucleasi Micrococcica e la rivelazione immunocitochimica dell'isoforma α dell'istone HP1 (α -HP1). Le cellule trasdotte con siBRG1 hanno dimostrato una maggior resistenza alla digestione con la nucleasi micrococcica rispetto ai controlli (Figura 11). Dato supportato anche dal secondo saggio (Figura 11).

4.1.5 La senescenza potrebbe associarsi con danni al DNA.

I danni al DNA rappresentano un contributo critico per la senescenza. Le specie reattive all'ossigeno (ROS) sono tra gli agenti danneggianti più nocivi. Essi sono dei sottoprodotti del normale metabolismo e come una malattia cronica, persistono contribuendo al graduale invecchiamento di un individuo (Lombard et al., 2005, von Zglinicki et al., 2001).

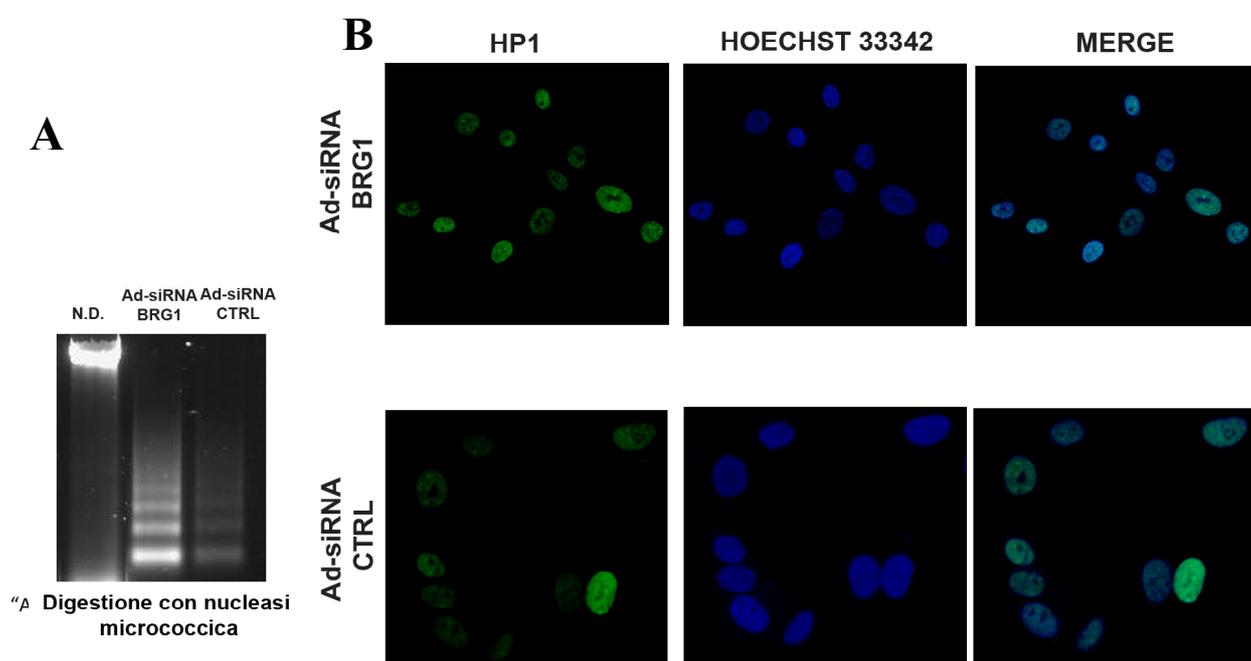
Il prodotto maggiormente rappresentato dal DNA danneggiato dai ROS è l'8-oxo-

deossiguanosine (oxo8dG). Si è allora deciso di studiare i livelli di danno al DNA mediante rivelazione immunocitochimica diretta sia contro la forma fosforilata dell'istone H2A.X (ser 139) (γ -H2A.X), che evidenzia uno stato generale di danno al DNA sia della presenza dell'oxo8dG. A seguito della trasduzione con siBRG1 si è osservato un aumento del numero di cellule positive all'anti γ -H2A.X (Figura 12). Allo stesso modo abbiamo evidenziato un aumento efficace anche delle cellule positive all'oxo8dG ($p < 0,05$), quando veniva silenziato il gene BRG1 (Figura 12).

La down-regolazione di BRG1 non mostra alcun effetto sull'espressione del manganese-dependent superoxid dismutase (SOD2), mentre si è rilevato un aumento dei livelli della proteina catalase; entrambi gli enzimi sono coinvolti nel ridurre gli agenti ossidanti nelle cellule (Figura 12) (Giorgio et al., 2007).

Il giusto equilibrio tra agenti danneggianti e i meccanismi di riparo al DNA, creano nella cellula le condizioni adatte per la sopravvivenza (Hoeijmakers, 2001, Ronen, Glickman, 2001). Si è deciso allora di valutare se questo aumento del danno al DNA osservato si accompagnasse ad una riduzione dei geni coinvolti in diversi meccanismi di riparo. Di conseguenza si è passati ad analizzare un pannello di geni coinvolti nella regolazione del *base excision repair* (BER) del *nucleotide excision repair* (NER), del *mismatch repair* (MER) e del *double strand break repair* (DSBR). Di rilevante è come molti dei geni analizzati evidenziano una significativa upregolazione ($p < 0,05$) nelle cellule trasdotte con siBRG1. In particolare, si è osservato un forte aumento dei geni POLD3 e MSH5 coinvolti nel pathway MER, e RAD23A per il pathway NER. E' stata inoltre analizzata la capacità delle MSC di riparare danni al doppio filamento, che rappresentano le forme di danno al

Figura 11



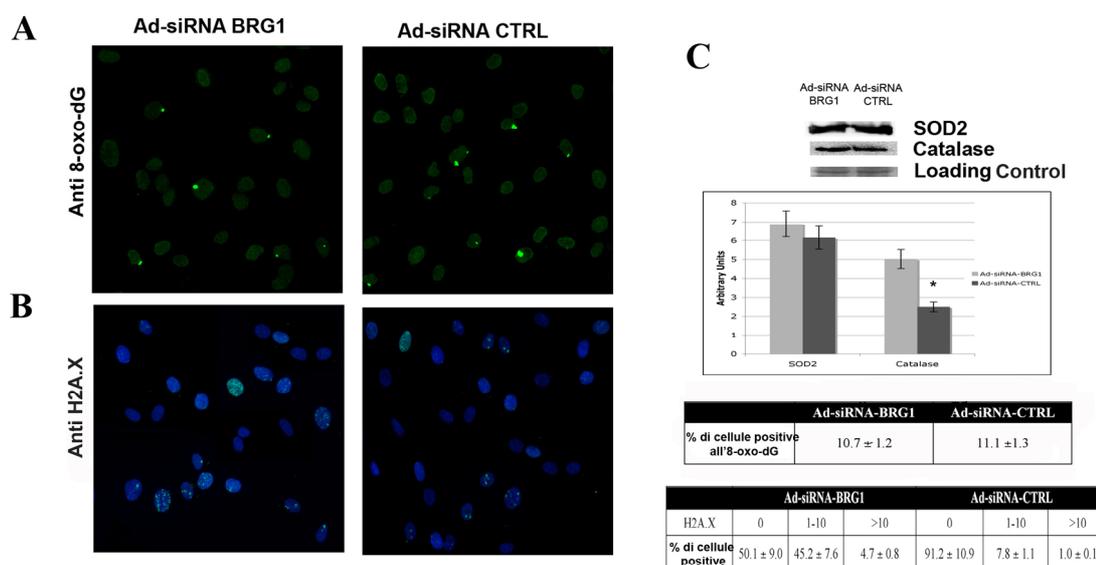
	Ad-siRNA-BRG1	Ad-siRNA-CTRL
Media dell'intensità di cellule positive alla colorazione per HP1	1.23 ± 0.21 *	0.48 ± 0.15

Il ruolo di BRG1 nel danno al DNA.

A: L'immagine mostra la corsa elettroforetica di un gel d'agarosio di DNA genomico da MSC trasdotte con Ad-siRNA-CTRL e Ad-siRNA-BRG1. Le stesse quantità di DNA sono state digerite con la nucleasi micrococcica e poi caricate su gel. L'immagine mostra che la digestione con la nucleasi ha prodotto un modello laddering. E' evidente che il DNA da campioni con BRG1 silenziato è più resistente alla digestione. N.D. è il DNA di controllo non digerito.

B: Le microfotografie a fluorescenza rappresentano le cellule colorate con anticorpi anti- γ -HP1(verde) e con Hoechst 33342 (blu). Un campo microscopico è rappresentanto per ogni trattamento. I valori d'espressione sono indicati nella tabella (\pm SD, n = 3). In questo test abbiamo contato almeno 500 cellule positive a HP1 per ogni trattamento. L'intensità di colorazione per ogni cellula positiva è stata acquisita con una fotocamera CCD e analizzati con il software Quantity One 1-D (Biorad Laboratories, CA, USA). Abbiamo calcolato la somma dei valori dei pixel fluorescenti delle cellule positive a HP1 e quindi determinato l'intensità media dei pixel fluorescenti che è stata espressa come unità arbitrarie.

Figura 12



Il ruolo di BRG1 nel danno al DNA.

A: Le microfotografie a fluorescenza rappresentano le cellule colorate con anticorpi anti-8-oxo-dG (verde).

B: Le microfotografie a fluorescenza rappresentano H2A.X (verde) e Hoechst 33342 (blu). I valori medi espressione di 8-oxo-dG sono indicati nelle corrispondenti tabelle (\pm SD, n = 3). Il grado di fosforilazione H2A.X è stato valutato contando il numero di foci H2A.X/cellule. Abbiamo classificato le cellule in tre gruppi: cellule H2A.X negative (0 foci/cellula); fosforilazione mite di H2A.X (1 - 10 foci/cellula); forte fosforilazione di H2A.X (> 10 foci / cellulare). (\pm SD, n = 3) (**p < 0,01).

C: analisi mediante western blot dei livelli di catalasi e SOD2 in MSC trattate con Ad-siRNA-BRG1 e Ad-siRNA-CTRL, rispettivamente. I livelli di proteina sono stati normalizzati rispetto alla totale delle proteine caricate. L'istogramma mostra i valori medi dell'espressione proteica (\pm SD, n = 3).

DNA più pericolose. Il saggio del riparo del plasmide *in vitro* ha dimostrato un enorme riparo nell'estratto proteico di controllo proveniente dalle cellule HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), mentre le MSC evidenziano un'attività scarsa nel riparare il plasmide e non si evidenzia alcun effetto in seguito al silenziamento di BRG1 (Figura 13).

4.1.6 RB e P53 crosstalk

Diversi studi hanno riportato che BRG1 lega i membri della famiglia del retinoblastoma e P53 (Kang et al., 2004, Strober et al., 1996). Questi geni sono importanti nell'arresto della progressione del ciclo cellulare, nel differenziamento, nell'apoptosi e/o nella senescenza (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007, Oberdoerffer, Sinclair, 2007) .

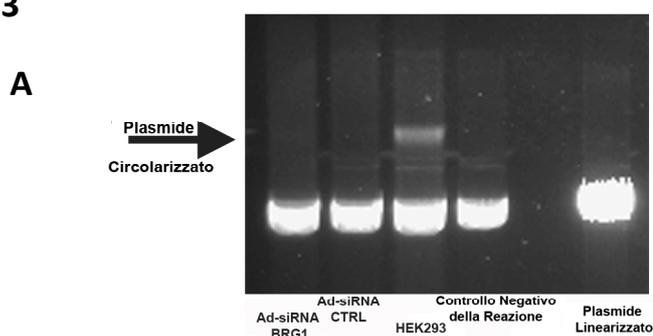
Alla luce di tali dati, si è cercato di valutare se gli effetti biologici evidenziati con il silenziamento di BRG1 possono essere associati ai *pathways*, che prevedono l'attivazione di P53 o un coinvolgimento dei membri della famiglia del retinoblastoma.

Non si è osservata alcuna modifica ai livelli di mRNA di RB ma una leggera diminuzione del livello della proteina. Diversamente l'espressione di RB2/P130 è fortemente up-regolata (Figura 14). Inoltre la down-regolazione *in vitro* di BRG1 non ha manifestato alcun cambio significativo nei livelli di mRNA e di proteina di P53 (Figura 14).

Come risposta allo stress genotossico, P53 subisce delle modifiche post-traduzionali, il cui risultato è di attivare la funzione della stessa. In particolare la fosforilazione della serina 392 e/o l'acetilazione della lisina 382 si verificano in seguito a danni al DNA (Sakaguchi et al., 1998). Il silenziamento di BRG1 non implica alcun effetto sull'espressione globale della proteina P53, al contrario le forme attivate e fosforilate sono *up-regolate* (Figura 14).

Alcuni inibitori delle cicline come $P21^{CIP1}$, $P27^{KIP1}$, e $P16^{INK4}$ si sovrappongono ai *pathways* della famiglia di RB e di P53. In particolare $P21^{CIP1}$ e $P16^{INK4}$ sono spesso espressi in cellule senescenti. Dopo il silenziamento di BRG1, si è osservata una leggera *up-regolazione* sia dei livelli di mRNA che di proteina di $P21^{CIP1}$, mentre nessuna modifica è stata osservata per $P16^{INK4}$ (Figura 14). Questi risultati suggeriscono che i *pathways* di RB e P53 non possano fare affidamento su queste CKI per promuovere gli effetti biologici. Molto probabilmente il punto temporale scelto per analizzare gli effetti del silenziamento di BRG1 potrebbe essere adeguato per valutare gli effetti biologici e non i cambi nell'espressione delle CKI.

Figura 13



B

		Ad-siRNA-BRG1	Ad-siRNA-CTRL
MER	<i>MSH2</i>	1.77 ± 0.21	0.65 ± 0.11
	<i>POLD3</i>	1.38 ± 0.21	0.42 ± 0.08
	<i>PRKDC</i>	n.d.	n.d.
	<i>TREX1</i>	1.74 ± 0.29	0.65 ± 0.12
	<i>MLH1</i>	1.52 ± 0.21	0.74 ± 0.14
	<i>MSH5</i>	0.31 ± 0.04	0.10 ± 0.02
BER	<i>MBD4</i>	0.45 ± 0.08	0.40 ± 0.09
	<i>MUTYH</i>	1.08 ± 0.15	0.91 ± 0.14
	<i>OGG1</i>	0.87 ± 0.15	0.61 ± 0.11
	<i>FEN1</i>	1.49 ± 0.15	0.60 ± 0.10
	<i>MPG</i>	1.06 ± 0.16	0.21 ± 0.03
	<i>NTLH1</i>	0.98 ± 0.18	0.91 ± 0.17
NER	<i>XPA</i>	0.92 ± 0.16	0.94 ± 0.17
	<i>ERCC3</i>	0.83 ± 0.14	0.35 ± 0.06
	<i>SLK</i>	0.85 ± 0.15	1.06 ± 0.21
DSB	<i>RAD23A</i>	2.22 ± 0.26	0.40 ± 0.07
	<i>XRCC4</i>	1.54 ± 0.24	0.74 ± 0.13
	<i>BRCA3</i>	0.42 ± 0.07	0.54 ± 0.08
	<i>MRE11A</i>	1.12 ± 0.14	0.94 ± 0.14

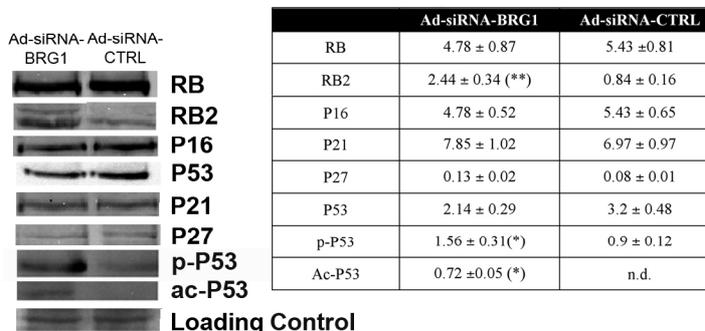
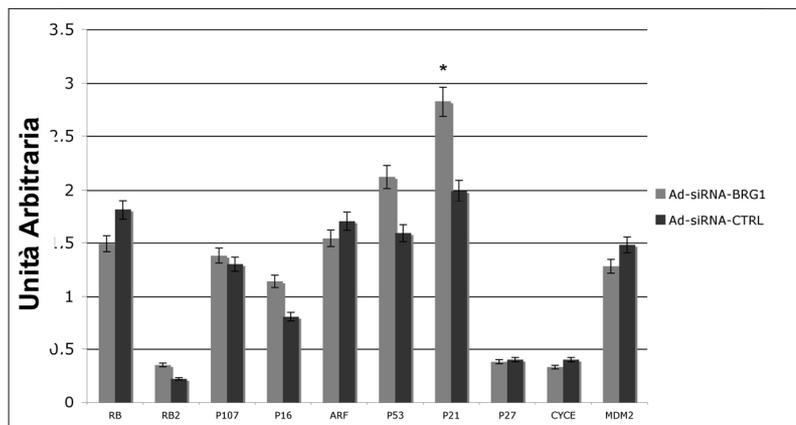
“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”
 Testi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
 Università degli Studi di Sassari

Il ruolo di BRG1 nel riparare i danni al DNA.

A: L'immagine mostra elettroforesi su gel di agarosio del plasmide pcDNA3 digerito con l'enzima EcoRI e poi trattato con i lisati proteici per consentire al DNA in vitro un eventuale riparo. I lisati proteici sono stati ottenuti da cellule staminali mesenchimali trattate con Ad-siRNA-BRG1 e Ad-siRNA-CTRL, rispettivamente. Le cellule embrionali umane del rene 293 (HEK) sono state scelte come controllo positivo per il saggio. La riparazione delle rotture a doppio filamento produce plasmidi riparati (ricircularizzati) che migrano distintamente dal DNA lineare.

B: In tabella sono mostrati i livelli di mRNA analizzati mediante RT-PCR (** p <0,01). I numeri sono espressi in unità arbitraria.

Figura 14



Analisi dell'espressione genica dei pathways di RB e P53 in MSC in seguito a trattamento con Ad-siRNA-BRG1 e CTRL.

A: L'istogramma mostra i valori medi d'espressione dei livelli di mRNA analizzati mediante RT-PCR (* p <0,05).

B: L'immagine mostra le bande ottenute dai WB dopo l'acquisizione al ChemiDOC (Biorad). I livelli di proteina sono stati normalizzati sul totale delle proteine caricate. p-P53: anti-P53-fosforilata su Ser15; ac-P53: anti-P53-acetilata su Lys 379. La tabella mostra i valori medi d'espressione (\pm SD, n = 3) (* P <0,05, ** p <0,01)

Si è deciso, allora, di valutare nel dettaglio il ruolo della famiglia RB e di P53 nei processi di apoptosi e senescenza a seguito del silenziamento di BRG1. A tal fine, si è sfruttata la capacità della proteina adenovirale E1A di legare e inibire sia i membri della famiglia del retinoblastoma che P53. Per bloccare in modo selettivo o i membri della famiglia o P53 sono state usate due proteine mutate. Le cellule sono state trasfettate con un vettore adenovirale, che esprimeva la proteina mutata E1A-(YH47-928), capace di interagire e inibire solo la proteina P53 e un secondo vettore che esprimeva invece la mutazione RG2 capace di bloccare e inibire solo i membri della famiglia del retinoblastoma (Dornan et al., 2003, Wang et al., 1993). Nelle MSC trasdotte con sh2045 e rispettivi controlli, è stato inibito P53 con E1A-(Y47-928) o la famiglia RB con E1A-RG2. Sia RB che P53 giocano un ruolo fondamentale nel fenomeno della senescenza, come dimostrato dal saggio della β -galattosidase *in situ*, in cui si evidenzia una riduzione della percentuale di cellule positive, quando veniva silenziato BRG1 e una delle due proteine veniva bloccate. Diversamente, i membri della famiglia del retinoblastoma mostrano un ruolo di protezione contro l'apoptosi, come dimostrato dal saggio immunocitochimico diretto contro l'annexina V, in cui si evidenzia un aumento delle cellule positive al saggio (Tabella 2).

Tabella 2

	Cellule Senescenti %
Ad-siRNA-BRG1	26.2 \pm 3.1 *
Ad-siRNA-CTRL	9.5 \pm 1.4
Ad-siRNA-BRG1 + Ad-E1AYH47 (P53 \perp)	18.5 \pm 2.7 #
Ad-siRNA-BRG1 + Ad-E1ARG2 (RB \perp)	18.2 \pm 2.4 #

Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

Cellule Apoptiche %	
Ad-siRNA-BRG1	12.4 ± 2.2 *
Ad-siRNA-CTRL	28.3 ± 3.0
Ad-siRNA-BRG1 + Ad-E1AYH47 (P53 ↓)	22.3 ± 3.7
Ad-siRNA-BRG1 + Ad-E1ARG2 (RB ↓)	42.2 ± 3.1 #

* (p<0.05 campioni comparati tra Ad-siRNA BRG1 e controllo)

(p<0.05 campioni comparati tra Ad-siRNA BRG1 e cellule trattate con P53 ↓ and RB ↓)

4.2 RB family

4.2.1 Il silenziamento dei membri della famiglia del Retinoblastoma

Le MSC umane sono state testate per knockdown di RB, RB2/P130 e P107 dopo trasduzione con vettori lentivirali e selezionate con puromicina. Le cellule che esprimevano gli shRNA contro RB, RB2/P130 e P107 sono state indicate con le sigle shR1, shR2 e sh107, rispettivamente. Le cellule, che esprimono shRNA di controllo, sono state indicate come shCTRL.

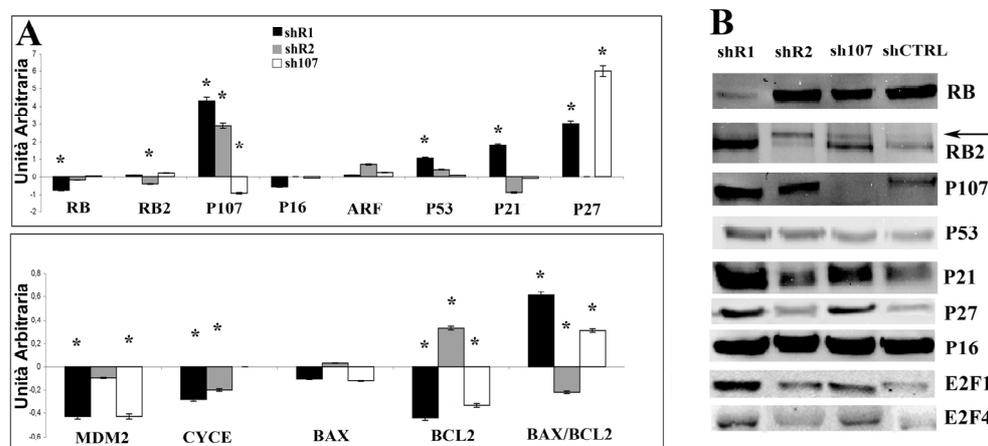
Gli shRNAs selezionati sono stati efficaci nel silenziare le proteine bersaglio e hanno indotto una diminuzione dell'mRNA bersaglio, rilevate mediante RT-PCR (Figura 15). Il silenziamento è stato ulteriormente verificato attraverso l'analisi dei livelli proteici di geni bersaglio che hanno confermato una diminuzione delle proteine bersaglio (Figura 15). In particolare si è rilevato un calo del 70% della proteina RB in shR1 rispetto ai controlli mentre sia i livelli di P107 che quelli di RB2/P130 sono aumentati in maniera rilevante. E' stata invece rilevata una diminuzione del 40% della proteina RB2/P130 in shR2, ma la proteina presente è quasi completamente nella sua forma iperfosforilata, ossia nella sua forma inattiva, mentre i livelli di P107 aumentano in modo efficace rispetto al shCTRL. Infine nelle cellule con P107 silenziato, è evidenziabile un calo quasi totale della proteina bersaglio e una *up*-regolazione di RB2/P130 (Figura 15).

4.2.2 Effetti sulla crescita cellulare

Le cellule silenziate di RB2/P130 mostrano un incremento rilevante (p<0,05) nella proliferazione cellulare comparata con i controlli, al contrario di quella dove è silenziato RB. Questi dati sono in accordo con quelli della citometria a flusso. In dettaglio, in diversi esperimenti si è osservato una riduzione della fase S e un incremento della fase G1 nelle cellule trattate con shR1 e diversamente un incremento della fase S e una riduzione della fase G1 quando invece venivano trattate con shR2 (Figura 16B). I risultati della citometria a flusso, sebbene mostrino differenze tra i diversi campioni, non erano

statisticamente efficaci, poiché la maggioranza delle cellule si trovano in fase G1/G0, come già riportato per le colture *in vitro* di MSC (Holzwarth et al.). Per ulteriore conferma dei dati ottenuti si è effettuato il saggio dell'incorporazione della BrdU. Circa 12,2% delle cellule silenziate per RB2 sono risultate positive rispetto al 5% osservato nei controlli ($p < 0,05$) (Figura 16C).

Figura 15

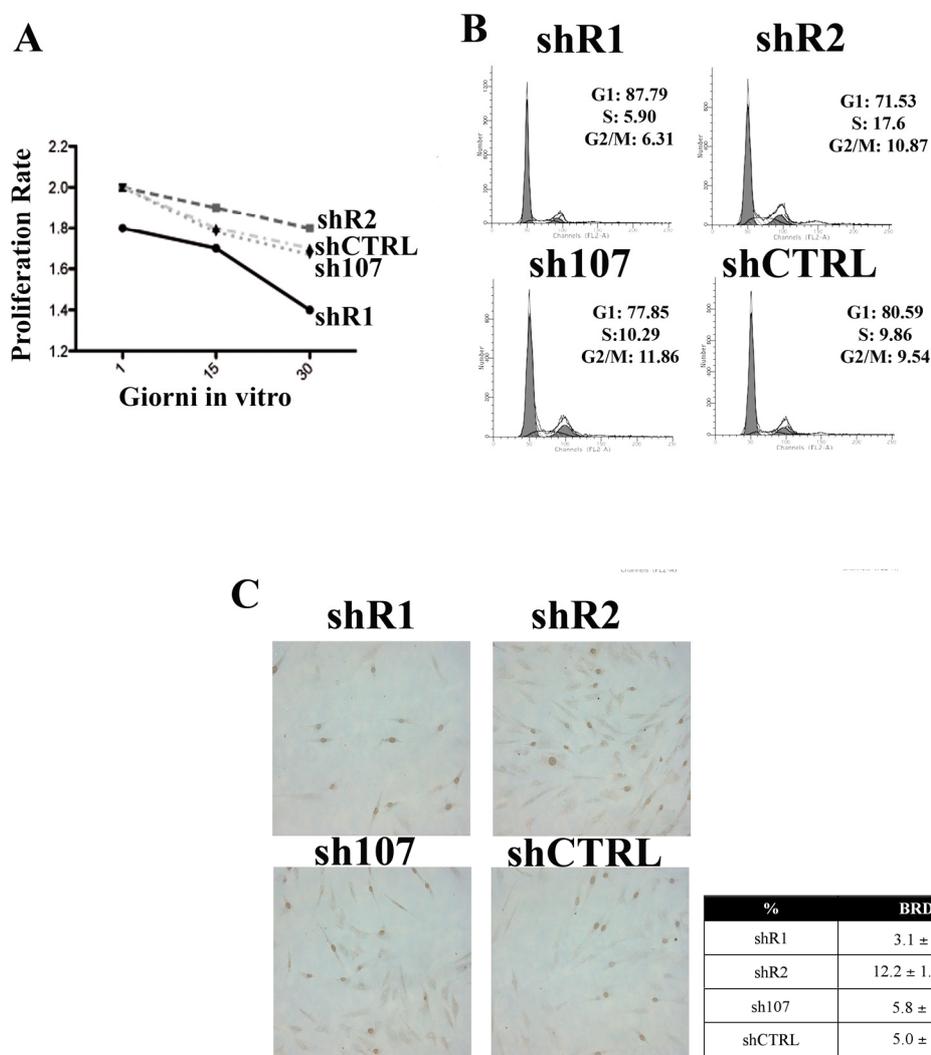


Il silenziamento della famiglia del retinoblastoma

A: Nelle cellule che esprimono sia shR1, o shR2 o sh107 i livelli di mRNA dei geni oggetto di analisi sono stati normalizzati rispetto alle cellule esprimenti shCTRL. L'istogramma mostra i valori di espressione media (\pm SD, $n = 3$; * $p < 0,05$).

B: Analisi dei Western blot in MSC che esprimessero shR1, shR2, sh107 e shCTRL. La freccia indica la forma RB2/P130 iperfosforilata (forma inattiva).

Figura 16



Effetto del silenziamento sulla crescita delle cellule

A: La proliferazione cellulare è stata valutata con il Quick Cell Proliferation Assay kit II (Biovision, CA, USA). Le cellule silenziate sono state piastrate nei pozzetti di una MW da 96, dopo 1, 2, 15, 16, 30, 31 giorni le cellule sono state raccolte e contate. Il rapporto tra il numero totale di cellule al giorno "n" ed il numero di cellule al giorno "n-1" è stato considerato come il tasso di proliferazione.

B: L'istogramma mostra l'analisi dei FACS di cellule staminali mesenchimali trasdotte con i Lenti-siRNA. L'esperimento è stato condotto 15 giorni dopo aver piastrato le cellule, come riportato nel pannello A.

C: L'immagine al microscopio mostra un campo rappresentativo di BrdU (marrone) in cellule tradotte con shR1, shR2, sh107 e shCTRL. L'esperimento è stato condotto 15 giorni dopo aver piastrato le cellule. La tabella riporta i valori medi d'espressione e le deviazioni standard (SD) (n = 3, ** p < 0,01). Le differenze tra shR1-sh107 e shCTRL non sono da considerarsi rilevanti.

4.2.3 Effetti opposti sulla senescenza e apoptosi

Il saggio dell'annessina ha evidenziato una ridotta percentuale di cellule apoptotiche in colture silenziate di RB2/P130 rispetto ai controlli. Al contrario nessuna modifica si è verificata in shR1 e sh107 (Figura 17A). La riduzione dell'apoptosi in cellule staminali mesenchimali è in accordo con delle precedenti ricerche, che dimostrano che l'iper-espressione di RB2/P130 induce la morte programmata della cellula (Jori et al., 2005a).

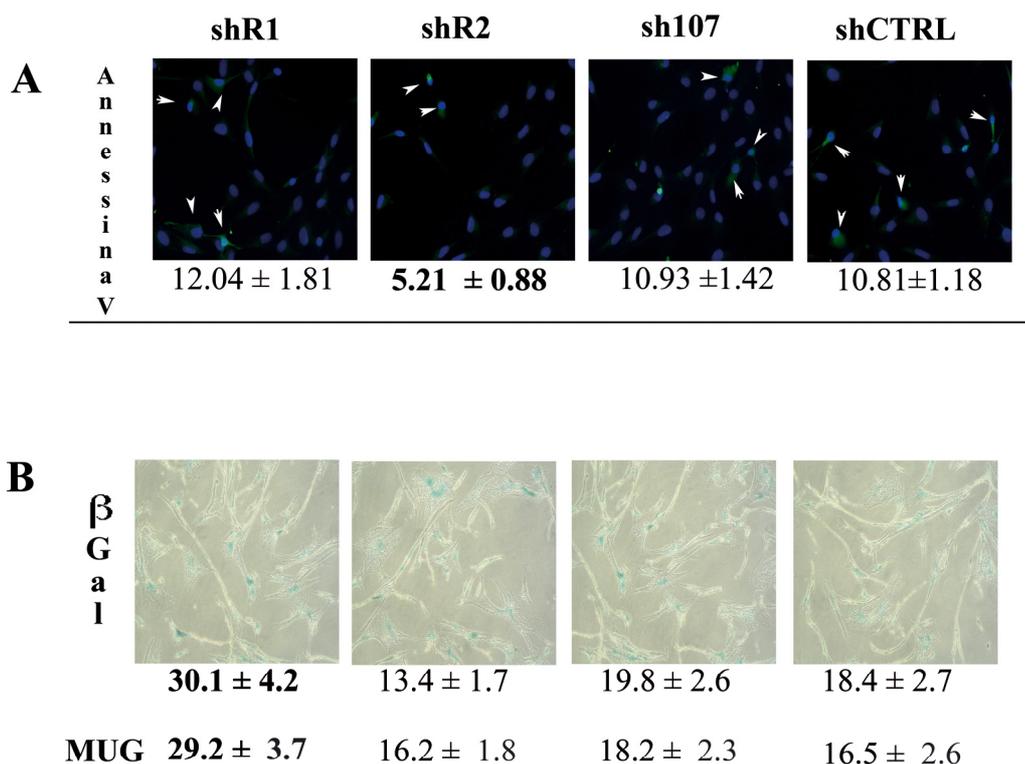
E' stato evidenziato, inoltre, un aumento del fenomeno della senescenza in shR1, come rilevato dal saggio della beta-galattosidasi, rispetto alle cellule trasdotte con shCTRL (Figura 17B). Le cellule positive alla beta-galattosidasi hanno mostrato la morfologia caratteristica della senescenza (cellule appiattite, e allargate). In shR1 era osservabile inoltre un aumento di cellule bi-nucleate (dati non riportati), altro segno distintivo delle cellule senescenti. Al contrario, la percentuale di cellule positive alla beta-galattosidasi era più bassa nelle shR2 rispetto a shCTRL (Figura 17B). E' da premettere però che la beta-galattosidasi è un test che potrebbe generare falsi positivi (Gary, Kindell, 2005). Di conseguenza si è deciso di confermare i dati ottenuti con un metodo quantitativo che potesse sia misurare l'attività della beta-galattosidasi, che rilevare eventuali cambiamenti poco percettibili qualitativamente. I risultati dell'analisi quantitativa hanno confermato i dati ottenuti con il saggio della beta-galattosidasi in situ (Figura 17B).

Come già detto il nucleo delle cellule senescenti, subisce diverse modificazioni che portano alla formazione di domini di eterocromatina facoltativa chiamata SAHF (Narita et al., 2003). E' da rimarcare come in shR1 la senescenza non fosse associata a un aumento della percentuale di SAHF, rilevate con il saggio ICC diretto contro l'istone- α -HP1 (Figura 18C). Diversamente nelle cellule con RB2/p130 silenziato, avveniva una diminuzione nel numero di cellule positive per l'istone- α -HP1 (Figura 18C).

4.2.4 Proteine della famiglia del retinoblastoma e danni al DNA

Studi approfonditi hanno rivelato come il danno al DNA o eventuali modifiche ai pathways di riparo siano legati alla senescenza e/o all'apoptosi (Lombard et al., 2005). Come risposta a eventuali danni al DNA, la cellula blocca la proliferazione e quindi si arresta nei checkpoint di controllo del ciclo cellulare oppure attiva eventuali *pathways* deputati al riparo degli eventuali danni. Se il danno è troppo esteso e quindi la cellula non è in grado di ripararlo può intraprendere due vie: andare in senescenza o in apoptosi. Le cellule dove erano stati silenziati i geni della famiglia del retinoblastoma

Figura 17



Effetto del silenziamento sull'apoptosi e sulla senescenza

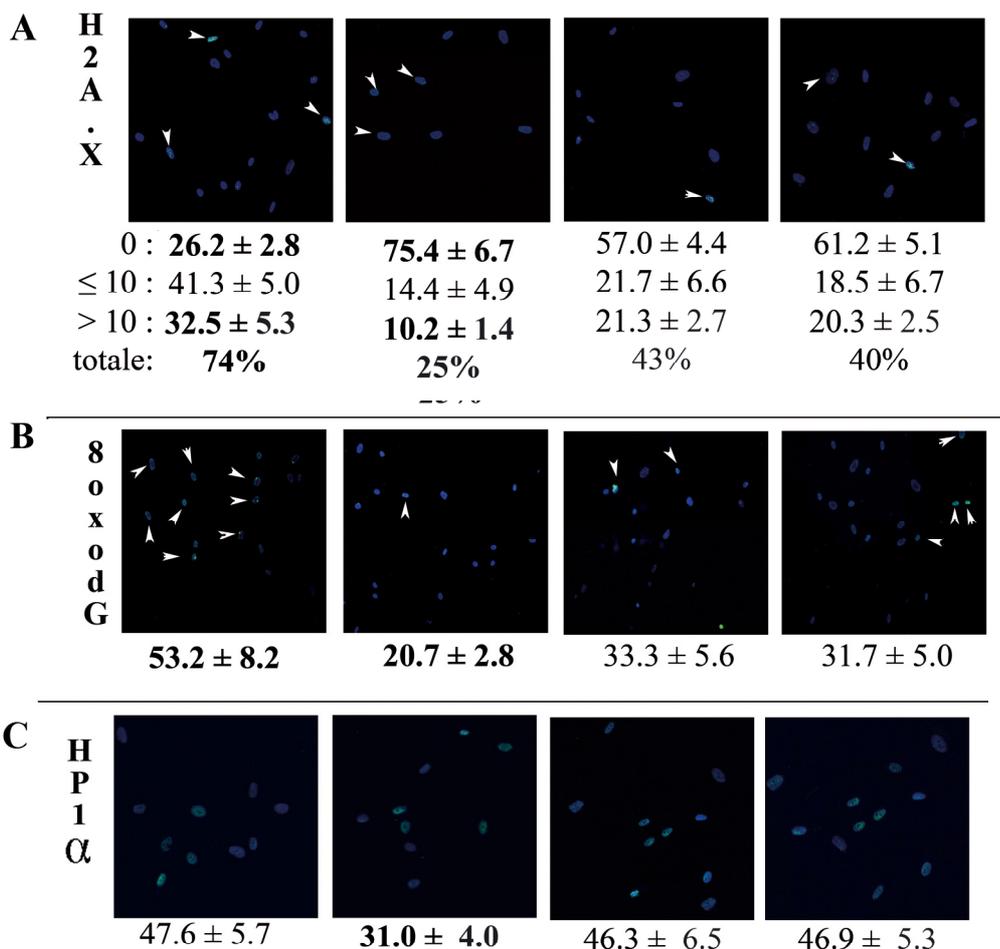
A: Le microfotografie mostrano campi rappresentativi di cellule marcate con annessina V (verde). I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342 (blu). Le frecce indicano le cellule positive all'annessina. Il valore medio della percentuale delle cellule apoptotiche (\pm SD, n = 3) è indicato sotto ogni immagine. Variazioni statisticamente rilevanti ($p < 0,05$) sono in grassetto.

B: Le microfotografie rappresentano campi microscopici di cellule positive alla β -galattosidasi (blu). Il valore medio delle percentuali di cellule senescenti (\pm SD, n = 3) è indicato sotto ogni immagine. Variazioni statisticamente significative ($p < 0,05$) sono in grassetto.

MUG indica i risultati della senescenza quantitativa associata alla β -galattosidasi effettuata sui lisati ottenuti dalle cellule. I dati sono espressi in unità arbitrarie. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte. Variazioni statisticamente significative ($p < 0,05$) sono in grassetto.

Figura18

shR1 shR2 sh107 shCTRL



Effetto del silenziamento sui danni al DNA e modifiche cromatiniche

A: Le microfotografie a fluorescenza mostrano cellule marcate con anti-H2A.X (verde) e Hoechst 33342 (blu). Un campo microscopico è rappresentato per ogni trattamento. Le frecce indicano la doppia marcatura. Il grado di fosforilazione H2A.X è stato valutato contando il numero di focolai H2A.X/cellule. Abbiamo classificato le cellule in tre gruppi: cellule H2A.X negative (0 foci/cellula); fosforilazione mite di H2A.X (1 - 10 foci/cellula); forte fosforilazione di H2A.X (> 10 foci / cellulare). La percentuale media di cellule positive a H2A.X è indicata sotto ogni immagine (\pm SD, n = 3). La valutazione statistica è stata eseguita sul totale delle cellule positive a H2A.X (n = 3), le variazioni significative (* p < 0,05) sono in grassetto.

B: Le microfotografie mostrano cellule colorate con anti-8-oxo-dG (verde). I nuclei sono colorati con Hoechst 33342 (blu). Un campo microscopico è rappresentato per ogni trattamento. Le frecce indicano cellule positive a 8-oxo-dG. La percentuale media di cellule positive all'8-oxo-dG è indicata sotto ogni immagine (\pm SD, n = 3). Variazioni statisticamente significative (p < 0,05) sono in grassetto.

C: Le microfotografie mostrano cellule colorate con anticorpi anti- γ -HP1- (verde) e con Hoechst 33342 (blu). Un campo microscopico è rappresentato per ogni trattamento. (\pm SD, n = 3). Variazioni statisticamente rilevanti (p < 0,05) sono in grassetto. In questo test abbiamo contato almeno 500 cellule positive a HP1 per ogni trattamento. L'intensità di colorazione per ogni cellula positiva è stata acquisita con una fotocamera CCD e analizzata con il software Quantity One 1-D (Biorad Laboratories, CA, USA). Abbiamo calcolato la somma dei valori dei pixel fluorescenti delle cellule positive a HP1 e quindi determinato l'intensità media dei pixel fluorescenti che è stata espressa come unità arbitrarie.

hanno mostrato cambiamenti nella percentuale sia dei fenomeni di senescenza che d'apoptosi e ciò ci ha indotto ad indagare l'eventuale presenza di danni al DNA. Si è evidenziato come nelle cellule con shR1, che erano inclini alla senescenza fosse riscontrabile un aumento dei danni al DNA, come dimostrato dal saggio di immunocitochimica diretto contro l'istone γ -H2A.X (Figura 18A). Tale dato è anche confermato dalla presenza dell'8-oxo-dG (Figura 18B). Al contrario in shR2, è stata evidenziata una percentuale ridotta di cellule positive sia anti H2A.X che anti 8-oxodG rispetto al controllo (Figura 18A e 18B).

Alessio Nicola

"Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare"

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

Nel complesso questi risultati hanno suggerito l'ipotesi che il silenziamento di RB e RB2/P130 può rendere queste cellule sensibili al danno del DNA. A conferma di tale ipotesi, le cellule staminali mesenchimali sono state trattate con tre diversi agenti che danneggiano il DNA: H_2O_2 , le radiazioni UV e la doxorubicina (Cleaver, Crowley, 2002). Nelle cellule di controllo (shCTRL) tutti i trattamenti hanno indotto un aumento nel numero di cellule marcate con anti- H2A.X fosforilato (Tabella 3).

E' noto che lo stress ossidativo è un fattore determinante per l'invecchiamento umano in vivo, e vi è una crescente evidenza che questo aspetto del processo di invecchiamento può essere riprodotto in vitro. E' stato pertanto dimostrato che l'aumento della concentrazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (per esempio, aumentando la pressione parziale di ossigeno o trattando le cellule con H_2O_2) può indurre senescenza precoce in fibroblasti umani.

E' da notare come a seguito dei trattamenti danneggianti il DNA, le cellule prive di RB evidenziano un aumento di cellule positive all'H2A.X rispetto ai controlli. Al contrario, le MSC con RB2/P130 silenziato mostrano una percentuale minore di cellule positive (Tabella 3).

H_2O_2 induce la formazione di radicali idrossili, che danneggiano le basi del DNA, generando delle forme ossidate come accade con l' 8-oxo-dG (D'Errico et al., 2008). Per questo motivo, i suoi effetti sono stati ulteriormente valutati mediante ICC diretta contro l'8-oxo-dG. Le cellule trattate con shR1 e con perossido di idrogeno hanno indicato un maggior numero di cellule positive rispetto alle cellule di controllo, trattate solo con H_2O_2 , mentre le cellule trattate con shR2 e con H_2O_2 hanno mostrato una percentuale meno significativa rispetto al corrispondente shCTRL. La doxorubicina è un farmaco che stabilizza la topoisomerasi-II e induce danni a doppia elica nei filamenti di

Tabella 3

H2A.X	H ₂ O ₂				DOXORUBICINA			
foci/cellula	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>

H2A.X	NON TRATTATE				IRRADIAZIONE CON UV			
foci/cellula	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>
0	26%	75%	57%	61%	14%	66%	39%	40%
<10	41%	14%	22%	28%	47%	22%	30%	30%
>10	33%	11%	21%	21%	37%	12%	31%	30%
Totale cellule positive	74%*	25%*	43%	39%	85%*	34%*	61%	60%

0	10%	61%	33%	35%	12%	60%	41%	37%
<10	47%	29%	41%	41%	40%	30%	41%	41%
>10	43%	10%	26%	24%	48%	10%	18%	22%
Totale cellule positive	90%*	39%*	67%	65%	88%*	40%*	59%	63%

Oxo-8-dG	NON TRATTATE				H ₂ O ₂			
	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>
Totale cellule positive	53%*	20%*	33%	31%	61%*	33%*	49%	47%

COMET Assay	DOXORUBICINA			
	<i>shR1</i>	<i>shR2</i>	<i>sh107</i>	<i>shCTRL</i>
DNA damage quantitation	76.8*	20.3*	36.0	39.1

DNA (Kurz et al., 2004), è stato determinato l'effetto di questa sostanza mediante il saggio del COMET.

La quantificazione del DNA frammentato ha mostrato una più alta percentuale di DNA danneggiato in MSC silenziate di RB1 e un minor grado di frammentazione del DNA in cellule trattate shR2 rispetto al controllo (Tabella 3).

4.2.5 Meccanismi molecolari associati con il silenziamento delle proteine del retinoblastoma

A P53 è attribuito il ruolo di guardiano del genoma. La sua funzione è di rilevare il danno al DNA e come risposta indurre un arresto temporaneo della crescita, che consenta la riparazione del DNA o, in caso di danni estesi, promuova l'arresto irreversibile della crescita (senescenza) o induca la morte cellulare programmata (apoptosi). Questa funzione tumore-soppressiva di P53 previene la propagazione di cellule anormali a rischio di diventare cellule tumorali (Zuckerman et al., 2009). Inibitori delle ciclina-chinasi sono strettamente associati a P53 e la loro attivazione e/o inattivazione gioca un ruolo fondamentale nel destino della cellula, infatti, permette di determinare quale di esse andranno incontro a senescenza e quali incontro ad apoptosi (Zuckerman et al., 2009).

In shR1 è stata rilevata una up-regolazione significativa ($p < 0,05$) della proteina p53 con un aumento del livello di P27^{KIP1} e P21^{CIP1}, mentre nessuna modifica in P16^{INK4a} (Figura 15). L'aumentata espressione di questi geni è stata osservata anche a livello di mRNA (Figura 15). Questo risultato potrebbe suggerire che l'arresto del ciclo cellulare e senescenza nelle cellule con RB silenziato sia basato su *pathway* P53-P21-P27, piuttosto che su P16. Anche se diverse ricerche suggeriscono un ruolo primario per P16^{INK4a} nella senescenza (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007), diversi studi dimostrano che la senescenza replicativa e la senescenza accelerata dalle radiazioni ionizzanti sono accompagnate da un accumulo di P21^{CIP1}, e non correlano con P16^{INK4a} (Attema et al., 2009).

Cellule con RB2/P130 silenziato hanno mostrato danno al DNA di ridotta intensità. Questo si associa a una riduzione efficace dell'espressione di mRNA del gene P21, ma non ad una modificazione del suo livello proteico. Nessun cambiamento significativo è stato rilevato nella espressione di P53 e dei CKI (Figura 15). Questo risultato è in accordo con i dati che mostrano un ruolo importante di P53-P21 nell'arresto del ciclo cellulare, in seguito a danno del DNA per consentirne il riparo (Zuckerman et al., 2009). sh107 ha mostrato solo una forte up-regolazione di P27^{KIP1} rispetto ai controlli (Figura 15). E' noto che il silenziamento dei membri del retinoblastoma produce una de-regolazione dell'espressione di alcuni geni bersaglio come E2F (Sage et al., 2003). In shR1 si è, infatti, osservata una forte up-regolazione della proteina E2F1, mentre si è rilevato un minimo

aumento di E2F1 in cellule con RB2/P130 o P107 silenziato (Figura 15). Questa deregolazione dovrebbe promuovere il ciclo cellulare, ma non può spiegare perché le cellule shR1 entrino in senescenza. La senescenza osservata in shR1 potrebbe allora essere attribuibile a differenze nei livelli dei CKI e di P53 rispetto ai controlli. Inoltre, in shR1 è stata riscontrata una *up*-regolazione di E2F4 (Figura 15B). Va sottolineato che la famiglia dei fattori di trascrizione E2F, è composta da diversi membri che svolgono un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare e nel differenziamento. I membri E2Fs sono stati classificati come attivatori (E2F1-E2F3) o repressori (E2F4-E2F8) (Scime et al., 2008). È ragionevole ipotizzare che l'aumentata espressione di E2F1 in cellule con RB silenziato potrebbe essere contrastato dall'attivazione di E2F4.

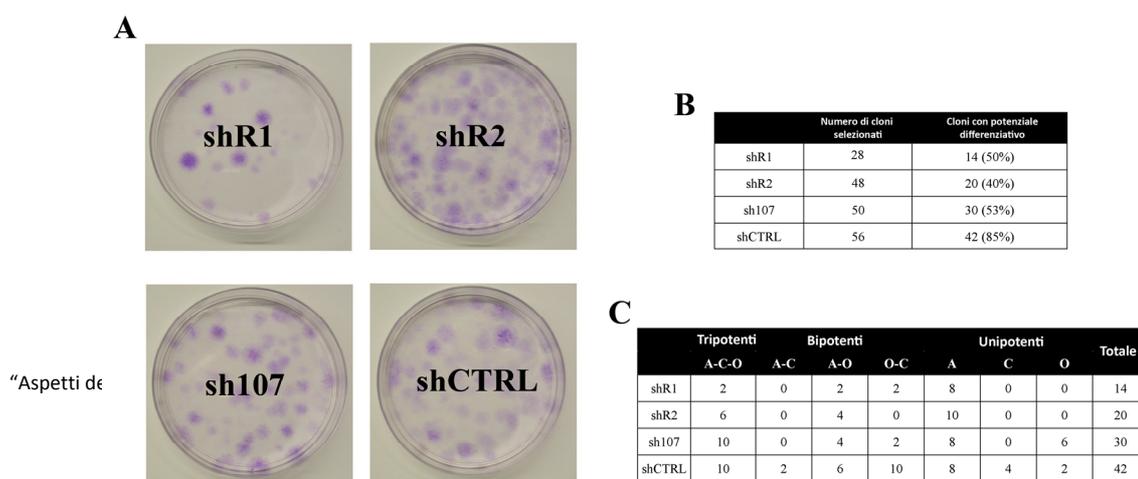
4.2.6 Il silenziamento dei geni della famiglia del retinoblastoma ha effetto sulle proprietà staminali delle MSC

Il controllo delle caratteristiche di staminalità (auto-rinnovamento, multipotenzialità) è strettamente legato alla regolazione del ciclo cellulare. È dunque ragionevole ipotizzare, che perturbazioni in cellule staminali mesenchimali con le proteine della famiglia del retinoblastoma silenziate abbiano in qualche modo modificato queste proprietà.

Su queste cellule è stato eseguito il test del CFU per testarne la clonogenicità, cioè la capacità di espandersi, partendo da una singola cellula, che è una delle caratteristiche più importanti delle cellule staminali, ossia la loro capacità di auto-rinnovo.

Il silenziamento del gene RB2/P130 ha evidenziato un raddoppio nel numero di cloni osservati. Al contrario la mancanza del gene RB ha mostrato una riduzione significativa ($p < 0,05$) di cloni (Figura 19A). Questo risultato è in buon accordo con i dati sulla proliferazione cellulare e sulla senescenza. Lo stato senescente osservato nelle cellule con RB silenziato potrebbe influire notevolmente sulla staminalità delle MSC, mentre il basso livello di senescenza e apoptosi osservato nelle cellule silenziate di RB2/P130 è in buon accordo con i dati ottenuti dai CFU. La mancata proliferazione potrebbe quindi anche interessare il processo di differenziazione. Si è valutata la multipotenzialità di

Figura 19



Effetto sulle proprietà di staminalità

A: Le immagini mostrano la colorazione viola dei cristalli nei cloni ottenuti dopo 14 giorni d'incubazione di MSC silenziate di RB, RB2/P130, P107 e CTRL.

B: La prima colonna della tabella indica il numero totale di cloni analizzati. La seconda colonna indica i cloni con la capacità di differenziare.

C: Il potenziale di frequenza e la differenziazione dei cloni di cellule staminali mesenchimali sono stati valutati come indicato nei Materiali e Metodi. Nella tabella sono indicati i cloni con la capacità tri-bi- e unipotenti. O, fenotipo osteogenico; C, fenotipo condrogenico; A, fenotipo adipogenico.

singoli cloni delle MSC ottenuti da diluizioni limitanti. A tal fine, sono stati isolati, ampliati e caratterizzati 182 cloni di MSC di controllo e di MSC con le proteine del retinoblastoma silenziate. Si è analizzata la loro potenzialità di differenziamento osteo-condro-adipogenico (OCA) con saggi in vitro.

Le colture di cellule staminali mesenchimali appaiono eterogenee nella morfologia e nel loro contenuto. Per questo motivo, le colture MSC sono composte da cellule progenitrici con tri-bi-e uni-potenzialità di differenziazione (Muraglia et al., 2000).

Nelle colture di controllo, l'85% dei cloni analizzati sono stati in grado di differenziare (colonna di destra della tabella in Figura 19B), di cui alcuni cloni (10 su 42) sono stati in grado di differenziarsi nelle tre linee, mentre altri si sono mostrati bipotenti o unipotenti

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

(ultima riga della tabella in Figura 19C). In contrasto con altri lavori (Muraglia et al., 2000), sono stati ottenuti cloni in grado di differenziarsi in tutte le possibili combinazioni fenotipiche (OA-, OC-, CA-cloni bipotenti; O, C, A-cloni unipotenti) (ultima riga della tabella in Figura 19C).

In tutti i cloni ottenuti da cellule con le proteine della famiglia del retinoblastoma silenziate, si è osservata una riduzione significativa ($p < 0,05$) nella capacità di differenziare: 50% in RB, il 40% in RB2/p130 e il 53% nei cloni di P107 rispetto al 85% dei cloni di controllo (Figura 19B). Questo risultato appare di grande interesse, perché mostra come la mancanza delle proteine del retinoblastoma comprometta il processo di differenziazione delle cellule staminali mesenchimali, nonostante gli effetti biologici differenti osservati in precedenza (proliferazione, danni al DNA, apoptosi, senescenza) siano diversi. I dati ottenuti dimostrano, che la differenziazione delle cellule è fortemente influenzata da tali effetti.

Il silenziamento dei geni del retinoblastoma influenza anche le proprietà di multipotenzialità dei cloni delle MSC (Figura 19C). In dettaglio, in shR1 non sono stati riscontrati tutti i fenotipi possibili come osservato nei controlli. Questo potrebbe essere in parte dovuto al basso numero di cloni, che hanno avuto la capacità di differenziare rispetto ai cloni shCTRL (Figura 18C). E' da sottolineare un criterio preferenziale dei cloni verso il differenziamento adipocitario: 8 su 14 cloni (57%) rispetto a 8 su 42 (19%) del controllo. Anche i cloni provenienti da shR2 hanno mostrato un numero ridotto nei fenotipi possibili e una tendenza verso il fenotipo adipogenico (10 su 20). Le differenze nella percentuale di cloni sh107 tra le colture e i controlli non sono indicative (Figura 19C).

Per rafforzare ulteriormente i dati, che dimostrano che il silenziamento di RB o di RB2/P130 si ripercuote sul fenotipo degli adipociti, è stato indotto il differenziamento adipocitario, in colture di MSC con le proteine del retinoblastoma silenziate ed in seguito si è valutata la percentuale di cellule con una morfologia adipocitaria mediante colorazione specifica per questo tipo di differenziamento (van Harmelen et al., 2005). Nelle cellule con RB o RB2/P130 silenziato, è stata osservata una percentuale statisticamente rilevante più alta di adipociti (11,28% e 8,60%, rispettivamente) rispetto ai controlli (5,3%) (dati non riportati).

4.2.7 Effetti del silenziamento di RB2/P130 a lungo termine

Nonostante sia stato dimostrato, che le cellule staminali mesenchimali umane e le altre popolazioni di cellule staminali, possano continuamente crescere in vitro per 10-20

passaggi (circa 30-90 giorni *in vitro*), sembra che le MSC, come tutte le altre cellule primarie, siano soggette al limite di Hayflick, cioè alla senescenza replicativa (Bernardo et al., 2007).

Risultati contrastanti sono stati pubblicati sulla capacità delle MSC umane di sottoporsi spontaneamente *in vitro* a trasformazione neoplastica (Bernardo et al., 2007).

Pertanto da tale premessa, si è deciso di analizzare l'effetto a lungo termine delle proteine del retinoblastoma silenziate sul comportamento delle cellule staminali mesenchimali. In accordo con quanto ipotizzato è stato recentemente dimostrato che la mancata funzionalità di RB, e in misura minore di RB2/P130, è associata a trasformazione neoplastica (Giacinti, Giordano, 2006).

Le colture di sh107 e shCTRL hanno mostrato un andamento simile nella crescita (Figure 20), il tasso di proliferazione *in vitro* non è cambiato significativamente per quasi 30 giorni, poi diminuisce fin quando dopo 80 giorni le cellule hanno smesso di crescere. Durante questo periodo, è stato rilevato un progressivo aumento della percentuale di cellule senescenti, come evidenziato mediante saggio con la beta-galattosidasi (dati non riportati). Le colture shR1 hanno mostrato un tasso di proliferazione più basso e arresto dopo 60 giorni (Figura 19). Dopo l'arresto, le cellule sh107, shR1 e quelle di controllo sono state monitorate per altri 60 giorni. In questa fase non si è verificata nessuna modifica nei campioni e si è osservato come le MSC morissero progressivamente, staccandosi spontaneamente dalle piastre.

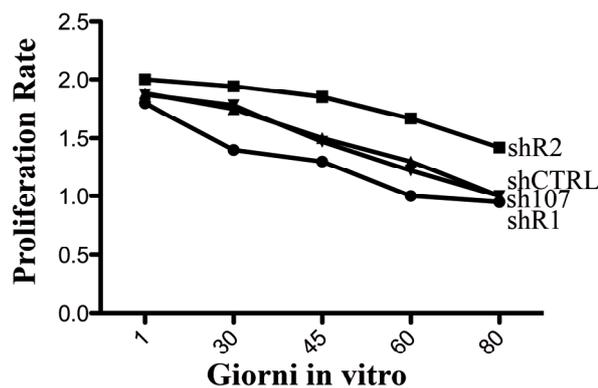
Le cellule trattate con shR2 hanno mostrato un particolare comportamento *in vitro*: all'inizio hanno mostrato una capacità proliferativa più elevata rispetto a quella del controllo; in seguito il loro tasso di proliferazione è progressivamente diminuito. Tuttavia, dopo 80 giorni *in vitro*, mentre tutte le altre colture (shR1, sh107, shCTRL) non proliferavano come rilevato dall'incorporazione della BrdU (dati non riportati), le cellule con RB2/P130 silenziate hanno mantenuto inalterata la loro capacità proliferativa (Figura 20). Le cellule con shR2 sono state coltivate per più di un anno, durante questo periodo il tasso di proliferazione non è cambiato, mantenendosi sempre molto basso. Sono state piastrate 5.000 cellule per cm² (circa il 30% confluenza) e la confluenza dell'80-100% veniva raggiunta circa dopo 30 giorni. Non è stato possibile eseguire la colorazione con la BrdU a causa del basso tasso di proliferazione (dati non riportati). Durante questo periodo non è stata osservata nessuna "fase di crisi" né una variazione nella morfologia epiteliale, ma si è riscontrato un rapporto maggiore tra nucleo e citoplasma, come dimostrato da Gro Vatne Røslund (Rosland et al., 2009) (Figura 21A). Otto mesi dopo l'espansione iniziale, sono state eseguite alcune analisi su shR2.

Il test dell'agar è un saggio di crescita utile a monitorare la capacità delle cellule di aderire e formare colonie. Esso è considerato tra i test più severi per la rilevazione di trasformazione maligna delle cellule. Sono state piastrate cellule provenienti da shRB2 e controlli appropriati per 21 giorni. Dopo questo periodo d'incubazione non è stata riscontrata la presenza di alcuna colonia (dati non riportati).

La trasformazione provoca un aumento dell'attività della telomerasi. Come dimostrato dagli studi di Gro Vatne Røsland e colleghi, che hanno riscontrato un significativo aumento della attività della telomerasi, successivamente alla trasformazione maligna delle cellule staminali mesenchimali (Rosland et al., 2009). Nel nostro caso le cellule con shR2 hanno mostrato un calo proporzionale dell'attività dell'enzima nel tempo (Figura 21 B).

Nonostante il lungo periodo di crescita le cellule con shR2 hanno mantenuto la loro capacità di differenziare in senso osteogenico che adipogenico come rilevato dalla colorazione con alizarin-Red e dall'Oil-Red, rispettivamente (Figura 21C).

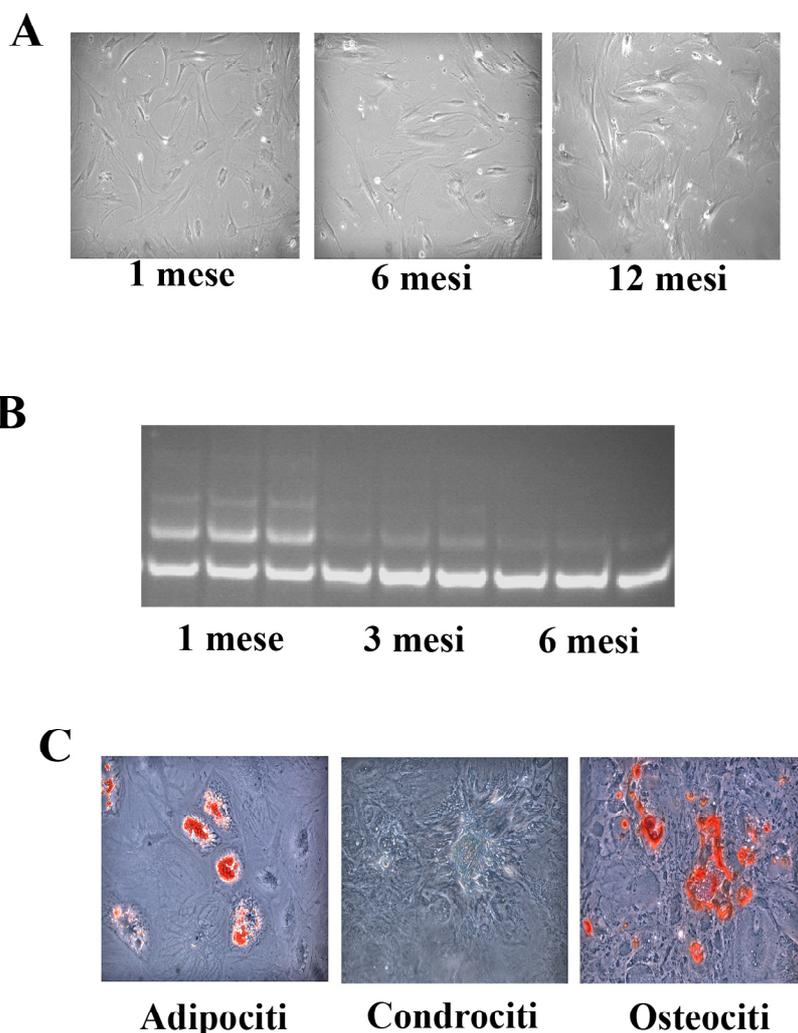
Figura 20



Effetto di “mettere a tacere” la crescita cellulare a lungo termine

La proliferazione cellulare è stata valutata con Quick Cell Proliferation Assay kit II (Biovision, CA, USA). Dopo aver silenziato le cellule, sono state piastrate in pozzetti di MW da 96. Dopo vari tempi le cellule sono state raccolte e contate. Il rapporto tra il numero totale di cellule al giorno "n" ed il numero di cellule al giorno "n-1" è stato considerato come il tasso di proliferazione cellulare. Si noti che il rapporto 1 sta ad indicare nessuna proliferazione.

Figura 21



Colture a lungo termine di cellule con shR2

A: Le microfotografie mostrano cellule con shR2 in diversi momenti acquisite con microscopio in contrasto di fase.

B: Elettroforesi su gel di poliacrilamide di prodotti ottenuti da TRAP su cellule shR2 in diversi momenti. L'immagine mostra i prodotti di PCR che stanno a indicare l'attività delle telomerasi. Nella prima fase della reazione, le telomerasi attive negli estratti cellulari aggiungono un numero variabile di ripetizioni telomeriche (TTAGGG) sul 3' di un substrato oligonucleotidico. La PCR che segue è usata per amplificare questi prodotti che sono poi caricati su gel di poliacrilamide.

C: Le microfotografie mostrano il potenziale di differenziazione di cellule shR2 che sono state coltivate per 12 mesi. Le cellule sono state indotte a differenziare in adipociti, osteociti e condrociti, come descritto nei metodi. La foto a sinistra mostra adipociti colorati con Oil Red. La foto al centro mostra condrociti colorati con Fast Green. Sulla destra sono visibili osteociti rivelati con la colorazione Alizarin Red.

5. Discussione e Conclusioni

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

L'invecchiamento è un processo irreversibile naturale, attualmente inevitabile e determinato da fattori genetici, che fa dell'uomo (e più in generale di tutti gli esseri viventi) un'entità programmata al decadimento attraverso il procedere del tempo che provoca il disfacimento delle funzioni vitali, biologiche, morfologiche e psicologiche.

L'invecchiamento interessa per molti aspetti le cellule staminali, le quali perdendo progressivamente la loro funzione sono rese inadatte alla rigenerazione e al mantenimento dell'omeostasi di organi e tessuti.

Negli ultimi anni, il panorama scientifico ha dato sempre più risalto alla ricerca sulle cellule staminali. Ciò è dovuto alle caratteristiche intrinseche di tali cellule, ossia, la capacità di differenziarsi in numerose linee cellulari e come già detto alla capacità di rigenerare i tessuti danneggiati nei quali sono localizzate. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) si prestano particolarmente bene a questo scopo poiché presentano caratteristiche uniche, in particolar modo quella di differenziare in cellule di origine mesodermale e non, e una spiccata attività immunomodulatoria, che le rende adatte in campo clinico ai trapianti autologhi e eterologhi.

Le MSC, come tutte le staminali adulte, rappresentano comunque una rara popolazione del tessuto, pertanto, per poterne fare un uso terapeutico, è essenziale la coltura *in vitro*. L'espansione in piastra è però compromessa dal fenomeno della *senescenza replicativa*.

Per molti aspetti, dunque, il fenomeno della *senescenza replicativa* rispecchia quello dell'invecchiamento cronologico.

L'espressione coordinata di un milione di geni determina i diversi stati cellulari e quindi anche la senescenza. Il passaggio della cellula staminale a uno stato differenziato e quindi specializzato, dipende dalla sincronizzazione simultanea della up-regolazione di geni tessuto-specifici e dal silenziamento di geni deputati al mantenimento delle caratteristiche uniche di staminalità. Questi processi sono legati anche a modifiche nello stato cromatinico della cellula, poiché il diverso grado di compattamento permette ai fattori trascrizionali l'espressione di alcuni geni e non di altri.

Recentemente diversi studi hanno dimostrato che anche i geni, che regolano le caratteristiche uniche di staminalità sono organizzati in strutture cromatiniche

(Oberdoerffer, Sinclair, 2007). Risulta quindi evidente che i diversi rimodellatori della cromatina giocano un ruolo chiave nella biologia delle cellule staminali.

I complessi SWI/SNF sono rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti e mostrano un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel differenziamento in diversi sistemi biologici.

Nelle cellule eucariotiche, BRG1 gioca un ruolo chiave nell'attivare un insieme diversificato di geni, reclutando direttamente i fattori trascrizionali. Il complesso agisce anche come repressore trascrizionale, un esempio è la modulazione negativa del gene del retinoblastoma (RB) coinvolto nel ciclo cellulare (Kang et al., 2004).

L'interazione di BRG1 con i membri della famiglia del retinoblastoma ha spostato il nostro interesse su questa seconda classe di geni. Nonostante questi geni siano tra i più studiati al mondo la maggior parte degli studi presenti nella letteratura scientifica indirizzano le proprie ricerche principalmente su RB. In questa ricerca si è deciso invece di studiare tutti i tre membri della famiglia (RB, RB2/P130, P107) in MSC per valutare proprietà molecolari simili o ridondanti ed effetti funzionali discordanti.

Le discussioni che seguono sono riportate in due sezioni differenti, la prima dedicata al silenziamento di BRG1 l'altra dedicata al silenziamento dei geni della famiglia del retinoblastoma.

5.1 Effetti del silenziamento di BRG1

Il nostro studio ha avuto come finalità quello di valutare l'effetto della mancanza del gene BRG1 utilizzando la tecnica dell'RNA interference, poiché dati in letteratura avevano già dimostrato come l'overespressione dello stesso inducesse senescenza nelle cellule staminali mesenchimali (Napolitano et al., 2007). Il risultato del tutto inaspettato è stato quello in cui il silenziamento di BRG1 induce un incremento di cellule senescenti come osservato anche durante l'overespressione del gene (Napolitano et al., 2007). Questo dato suggerisce che molto probabilmente piccole perturbazioni dello stato cromatinico della cellula possano indurre il fenomeno della senescenza e che quindi una regolazione "fine" del gene BRG1 è necessaria per preservarne le caratteristiche.

Lo stato senescente è accompagnato dal blocco del ciclo cellulare, poiché le cellule sono incapaci di rispondere a stimoli esterni. Un dato del tutto contrastante è

l'assenza dell'arresto del ciclo, suggerendo quindi che molto probabilmente BRG1 non svolga una funzione prioritaria nella progressione del ciclo cellulare, ma è pensabile che altri complessi SWI/SNF siano coinvolti.

Il silenziamento di BRG1 al contrario riduce la percentuale di cellule apoptotiche; questo dato, confermato anche in altri studi di [Napolitano et al., 2007](#), suggerisce un suo ruolo diretto nell'apoptosi. Come mostrato in figura 10 il silenziamento di BRG1 determina una diminuzione dell'apoptosi mentre un suo aumento si verifica quando il gene viene up-regolato. Molte cellule acquisiscono la resistenza all'apoptosi quando si trovano in uno stato senescente. La riduzione di cellule apoptiche osservate nel nostro sistema potrebbe essere una conseguenza della senescenza e non dipendente dal ruolo diretto del gene. L'osservazione che l'overespressione di BRG1 induce apoptosi con un incremento dell'espressione dei geni pro-apoptici dà credito alla prima ipotesi.

Lo stato senescente si accompagna nel nostro modello a un aumento dello stato eterocromatinico, come rilevato dal saggio immunocitochimico diretto contro α -HP1 e dalla digestione con la nucleasi micrococcica (Figura 11). Questo è in accordo con gli studi, che hanno dimostrato un accumulo di SAHF in cellule senescenti ([Narita et al., 2003](#)). La senescenza indotta dal silenziamento di BRG1 è associata a un accumulo di danni al DNA, nonostante un up-regolazione dei geni coinvolti nei meccanismi di riparazione. Per riordinare tutti questi elementi, è importante far presente che, nonostante l'incremento dell'espressione di alcuni geni coinvolti nel meccanismo di riparazione, le cellule sono incapaci di riparare un danno al doppio filamento del DNA; come dimostrato dal saggio di riparazione *in vitro* di DNA plasmidico (Figura 13). Tuttavia l'up-regolazione dei geni coinvolti nella riparazione al DNA potrebbe provocare un eccesso di segnale che attraverso un fenomeno a cascata sia in grado di perturbare le funzioni biologiche basali delle cellule per indirizzarle verso un fenotipo senescente. Questa ipotesi è in accordo con Morales e collaboratori che dimostrarono che l'iper-espressione di RAD50, un membro del complesso di riparazione di MRE11A, produce un eccesso di segnale, che compromette la funzione delle cellule staminali mesenchimali ([Morales et al., 2008](#)). A riprova di quanto appena chiarito e dello stato di senescenza evidenziato dai saggi eseguiti, sono le modifiche osservate dei livelli d'espressione dei geni coinvolti nel controllo delle proprietà delle cellule staminali. In particolare durante il

silenziamento del gene si è osservata la completa scomparsa del gene NANOG, gene chiave del circuito core OCT3/SOX2/NANOG/KLF4 (Figura 10); confermando i risultati ottenuti da altri ricercatori che hanno dimostrato che il knockdown di BRG1 nelle cellule staminali embrionali induce una perdita della pluristaminalità e del self-renewal (Kidder et al., 2009).

5.1.2 I pathways di RB e di P53 sono coinvolti negli effetti biologici osservati

I *pathways* di RB e P53 sono coinvolti nel controllo della progressione del ciclo cellulare, differenziamento, apoptosi e/o senescenza (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007, Oberdoerffer, Sinclair, 2007) . Diversi studi hanno dimostrato che BRG1 manifesta la sua funzione anche regolando questi *pathways* (Hendricks et al., 2004, Kang et al., 2004) L'espressione di RB sembra non subire alcuna modifica in seguito a silenziamento di BRG1; al contrario l'espressione di RB2/P130, un altro membro della famiglia, è fortemente up-regolato. In aggiunta, il silenziamento di BRG1 sembra indurre una attivazione della proteina P53, come osservato dall'up-regolazione della forma fosforilata ed acetilata (Figura 14). Questi risultati suggeriscono che gli effetti biologici evidenziati in seguito al silenziamento di BRG1 potrebbero interferire con i meccanismi che regolano le attività biologiche sia dei membri della famiglia del retinoblastoma che di P53.

Per capire quale dei due meccanismi potrebbe avere un ruolo in un processo o in un altro abbiamo inibito la proteina P53 con l'Ad-CMV-E1A (YH47-928) e i membri della famiglia del retinoblastoma con Ad-CMV-E1A (RG2) nelle MSC; le stesse cellule dove in precedenza è stato silenziato BRG1. La beta-galattosidasi ha mostrato una riduzione di cellule senescenti sia quando è inibita la via tramite P53, sia quando sono inibiti i membri della famiglia del Retinoblastoma (Tab.1). Questo dato è in accordo con gli studi che dimostrano che la senescenza è regolata sia tramite P53 che tramite le proteine del retinoblastoma. Tuttavia, in accordo con i nostri dati, studi recenti hanno dimostrato che diverse linee tumorali mancanti di BRG1 inducano un'attivazione della forma endogena di P53 wild-type, mostrando comunque un fenotipo senescente (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007, Naidu et al., 2009). Gli effetti sull'apoptosi osservati dal silenziamento di BRG1 sembrano essere correlati con le vie dei membri della famiglia del retinoblastoma, infatti, bloccando

queste proteine in cellule con BRG1 silenziato, è stata osservata una riduzione del fenomeno (Tabella 1). D'altra parte, è ampiamente dimostrato come RB abbia una funzione anti-apoptica e che quindi i suoi effetti siano contrari al ruolo svolto da P53 (Harbour, Dean, 2000).

5.2 Effetti del silenziamento dei geni del retinoblastoma

Il ruolo osservato dai membri della famiglia del retinoblastoma nei processi biologici quando BRG1 è down regolato ci ha spinto a indagare più in dettaglio su questi geni, che come già ampiamente rilevato sono tra i più studiati al mondo per le loro innumerevoli funzioni in cellule staminali e no.

E' stato evidenziato che le cellule staminali adulte sono necessarie a mantenere la funzione del tessuto per tutta la durata della vita e l'integrità di un organismo, sostituendo le cellule differenziate, che si sono perse per logoramento o per danno. Per assolvere questa funzione le cellule staminali sono dotate di una specifica combinazione flessibile e diversificata di espressione genica. Infatti, un buon funzionamento delle cellule staminali richiede il coordinamento della progressione del ciclo cellulare, dell'auto-rinnovo, e del processo differenziativo. Qualsiasi tentativo di comprendere la regolazione delle proprietà delle cellule staminali deve quindi includere un'analisi della relazione tra questi processi.

La famiglia genica del retinoblastoma codifica tre proteine strettamente correlate, che sono implicate nella regolazione della proliferazione cellulare, del differenziamento, dell'apoptosi, della senescenza e della trasformazione neoplastica. Abbiamo analizzato la biologia delle cellule staminali mesenchimali in assenza dei membri della famiglia del retinoblastoma, nel tentativo di chiarire l'importanza di questi geni nella regolazione della proliferazione cellulare, dell'auto-rinnovamento, dell'impegno nel processo differenziativo. Numerose evidenze sperimentali hanno reso evidente che le tre proteine hanno attività biologiche sia specifiche che funzionalmente rindondanti. (Claudio et al., 1994)

5.2.1 Il silenziamento di RB induce danni al DNA ed uno stato senescente

Un compito fondamentale di RB è di collegare lo sviluppo delle cellule con la replicazione del DNA (Helmbold et al.2010). L'iperfosforilazione di RB da parte dei

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

complessi ciclina-Cdk rappresenta un fattore essenziale per l'entrata in fase S. L'inattivazione di RB disturba l'equilibrio tra la segnalazione mitogena, ossia la replicazione programmata del DNA, e la progressione attraverso la fase S e la mitosi. Questi eventi sono la principale fonte di danno al DNA. In seguito alla prematura rottura delle forche di replicazione del DNA, si induce un danno al doppio filamento (DSB), e l'attivazione dei *pathways* in risposta al danno (Helbond et al.2010). Cellule con DNA danneggiato possono sia entrare in senescenza, che in apoptosi attraverso l'attivazione di p53-p21. In alternativa, nelle cellule prive di RB si accumulano ulteriori danni, che insieme all'inattivazione di p53 forniscono un'ulteriore barriera alla trasformazione oncogena (Fojier, te Riele, 2006).

Le MSC con RB silenziato accumulano danni al DNA, come evidenziato dall'immunocitochimica diretta contro H2AX e dall'incorporazione dell'oxo8dG (Fig. 17C-D). Questo porta all'attivazione di p53-p21-p27 con un aumento della senescenza e la perdita delle proprietà di autorinnovo come rilevato dal saggio della beta-galattosidasi e dal saggio CFU, rispettivamente (Fig. 15B, 3B, 4A).

I risultati ottenuti sono in contrasto con quelli riportati da Chicas e collaboratori che nei fibroblasti umani avevano silenziato le proteine del retinoblastoma con shRNAs ed avevano osservato l'induzione di senescenza da parte dell'oncogene RAS (Chicas et al.2010). Sebbene ogni shRNA fosse indirizzato a un solo gene della famiglia, solo quelli destinati a RB inducevano uno stato senescente. Gli stessi autori hanno notato inoltre un aumento di attivazione di p53 e di un concomitante aumento dei livelli della sua proteina bersaglio P21/CIP1 nelle cellule con RB silenziato; osservazione confermata anche dagli studi eseguiti sui nostri modelli d'indagine. Inoltre, abbiamo dimostrato che in shR1 si ha un chiaro aumento dei danni al DNA dovuto a un prematuro ingresso nella fase S del ciclo cellulare. Per riconciliare i dati finora discussi è importante sottolineare come le attività della proteina P53 e quelle del retinoblastoma dipendono da una moltitudine di fattori come ad esempio lo stato delle cellule, il grado di differenziazione cellulare, il tipo di cellula e segnali ambientali. Il gruppo di Chicas ha analizzato fibroblasti umani che sono stati artificialmente indotti allo stato senescente, e quindi resta da stabilire se le evidenze osservate in questa linea cellulare possono essere estese ad altri tipi di cellule e in altri sistemi.

5.2.2 Il silenziamento di RB2/P130 riduce lo stato apoptotico e senescente delle MSC

Nelle cellule con RB2/P130 silenziato, abbiamo osservato un aumento del tasso di proliferazione ed un aumento della proprietà di auto rinnovo, come rilevato dal test di CFU (Fig. 16A, 16C, 18A). Questi risultati sono in buon accordo con i dati che mostrano una riduzione dei danni al DNA, dell'apoptosi e della senescenza (Fig. 17A-D). Queste evidenze, inoltre, dimostrano che RB sia fondamentale per collegare la crescita delle cellule con la replicazione del DNA, mentre RB2 svolge un ruolo cruciale nella biologia cellulare in seguito ad un arresto reversibile (quiescenza) o irreversibili (senescenza) del ciclo cellulare (Helbond et al.2010). La ridotta percentuale di cellule senescenti in shRB2 è confermata dagli studi che hanno dimostrato che le cellule senescenti mostrano alti livelli di RB2/P130 (Jackson, Pereira-Smith, 2006), Questi risultati suggeriscono che RB2/P130 è la proteina della famiglia del retinoblastoma che più delle altre svolge un ruolo cruciale nella fase di senescenza avanzata, poiché partecipa a un arresto della crescita delle cellule al di là del punto di restrizione, formando complessi di repressione sui promotori E2F. Inoltre, i dati ottenuti in questo lavoro dimostrano che, almeno in alcuni tipi cellulari il *pathway* RB-P16 possono essere indispensabili per la senescenza, mentre e in altri contesti cellulari l'attivazione di p53 con un accumulo di RB2/p130 rappresenta uno degli eventi principali.

Anche a lungo termine, evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'accumulo di RB2/P130 rappresenta un evento cruciale per l'uscita definitiva dal ciclo cellulare e attivare programmi di senescenza. L'assenza di eventi di trasformazione anche dopo lunghi periodi in coltura conferma che la mancata espressione di RB2/P130 non è coinvolta nella trasformazione maligna. Tuttavia, non è possibile escludere che le cellule in shR2 a lungo termine non possano generare alterazioni nel loro cariotipo e modifiche di espressione genica.

5.2.3 Gli SAHF e la senescenza nelle MSC silenziate di RB, RB2/P130 e P107

I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano in maniera chiara che i focolai eterocromatici non possono essere sempre associati alla senescenza poiché in cellule con RB silenziato l'aumento della senescenza non si associa con una

maggiore percentuale di SAHF, inoltre nella stessa linea la percentuale di cellule positive per α -HP1 non è cambiata, mentre in quella shR2 la percentuale è significativamente ridotta ($p < 0,05$) suggerendo che SAHF e α -HP1 siano correlati con RB2/P130.

Queste evidenze non sono in contrasto con i risultati di Narita e collaboratori che hanno ipotizzato che la formazione di SAHF dipende da RB poiché l'espressione dell'oncoproteina E1A può prevenire la formazione di SAHF. Infatti, è importante indicare che in questo studio è stata utilizzata l'oncoproteina E1a che neutralizza non solo la funzione di RB ma quella di tutte tre le proteine, pertanto non si può escludere una rindondanza di effetti tra i tre membri della famiglia. (Narita et al., 2003).

5.2.4 Le MSC silenziate di RB, RB2/P130 e P107 mostrano il processo differenziativo compromesso

Tutti i cloni ottenuti da MSC, dove sono state silenziate le proteine della famiglia del retinoblastoma hanno mostrato, una efficace riduzione nella capacità di differenziare: 50% in RB, il 40% in RB2/P130 e il 53% in P107 rispetto all'85% nelle colture di controllo (Figura 18B). I nostri dati suggeriscono che tutti i tre membri della famiglia del retinoblastoma sono indispensabili per un corretto processo differenziativo delle cellule staminali mesenchimali. Tuttavia, il loro ruolo in questi processi può essere differente. La capacità di una cellula di differenziare implica l'uscita dal ciclo cellulare e l'entrata in uno stato quiescente. Le MSC con RB2/P130 silenziate hanno mostrato una proliferazione non del tutto regolare, quindi è ragionevole ipotizzare che l'alterazione nel processo di differenziazione può essere correlata con difetti da uscita del ciclo cellulare. D'altra parte, le cellule prive di RB hanno mostrato una riduzione nella proliferazione, per questo motivo, l'alterazione nel processo differenziativo potrebbe essere correlato ad altri fenomeni biologici, come la senescenza e l'apoptosi. La compromissione della capacità di differenziare delle MSC prive di P107, invece, è difficile da decifrare, poiché i principali parametri biologici (proliferazione, auto-rinnovamento, apoptosi e senescenza) non sono compromessi.

5.2.5 La mancanza di RB1 e di RB2/P130 sembra indirizzare le cellule verso un fenotipo adipocitario

Il ruolo principale dei membri della famiglia del retinoblastoma riguarda la regolazione del ciclo cellulare attraverso la repressione dei fattori trascrizionali E2F ((Galderisi et al., 2006)). Un aspetto altrettanto importante delle proteine del retinoblastoma è invece correlato allo sviluppo e alla differenziazione di molti tessuti, questo perché RB può attivare alcuni fattori di trascrizione, che promuovono il processo differenziativo ((Zhu, 2005)). E' stato dimostrato che i membri della famiglia del retinoblastoma sono regolati in modo differente durante il processo di differenziazione in particolare nel processo adipogenico e pre-adipogenico ((Hansen et al., 2004)).

Il reclutamento dei membri della famiglia del retinoblastoma da parte dell'antigene T del virus SV40 inibisce il differenziamento in adipociti (Higgins et al., 1996). Inoltre, il knockout di RB nei fibroblasti embrionali di topo ha mostrato l'incapacità di differenziarsi per la mancanza di PPAR- γ (Chen et al., 1996). Infine, la mancanza di RB nelle cellule MEF fa sì che queste differenzino preferenzialmente in adipociti bruni, piuttosto che adipociti bianchi (Hansen et al., 2004).

In contrasto con le ricerche sopra riportate, abbiamo dimostrato che la perdita di RB e RB2/P130 nelle MSC porta al differenziamento verso un fenotipo adipocitario. Per mettere ordine tra le nostre evidenze sperimentali e quelle qui sopra discusse è importante chiarire che le nostre analisi sono state condotte su cellule progenitrici multipotenti, mentre le altre indagini sono state effettuate su cellule di pre-adipociti e/o fibroblasti. Quanto finora discusso suggerisce quindi che le proteine del retinoblastoma potrebbero svolgere un ruolo complesso nell'adipogenesi. In particolare potrebbero essere indispensabili in cellule staminali pluripotenti, mentre nelle cellule già indirizzate la mancanza di RB potrebbe non essere così essenziale e pertanto queste cellule potrebbero ulteriormente promuovere processi già in parte avviati. Evidenze recenti confermano quanto appena discusso dimostrando che, paradossalmente, RB è in grado di inibire l'adipogenesi attenuando la capacità del fattore di trascrizione PPAR-gamma nel guidare l'espressione genica (Fajas et al., 2002). Le indagini svolte in questo lavoro di tesi insieme alle innumerevoli evidenze presenti in letteratura suggeriscono che il ruolo dei membri della famiglia

retinoblastoma nel differenziamento adipocitario rappresenti un tema ancora non del tutto chiaro che richiede ulteriori studi e indagini sperimentali.

5.2.6 Chi fa cosa?

Le tecniche di silenziamento sono un potente strumento per chiarire la funzione di un gene. Questo approccio, tuttavia, può dare informazioni parziali quando il gene oggetto di studio appartiene ad una famiglia genica. Per esempio, è ben noto che ogni membro della famiglia del retinoblastoma giochi un ruolo diverso nella proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi e senescenza, secondo il tipo di cellula, le fasi del ciclo cellulare e lo stato di maturazione cellulare. Inoltre, numerose evidenze indicano che RB, RB2/p130 e P107 sono in grado di svolgere effetti di compensazione reciproca. Questa sorta di ribilanciamento funzionale avviene quando una proteina A è in grado di svolgere una funzione di solito eseguita da un'altra proteina B, ma che in circostanze particolari, la proteina B non è più in grado di esercitare la propria attività biologica. Numerose evidenze hanno dimostrato che la compensazione può essere associata a un aumento dei livelli di proteina in altri casi queste considerazioni non si sono rivelate strettamente necessarie (Galderisi et al., 2006, Giacinti, Giordano, 2006, Paggi, Giordano, 2001). In conformità a queste premesse non è quindi semplice valutare il ruolo specifico delle proteine del retinoblastoma nei modelli sperimentali fin qui analizzati, anche perché il silenziamento di un gene ha determinato, come era prevedibile, l'up-regolazione degli altri (Figura 15). Le cellule prive di RB sono soggette a danno al DNA, questo è stato associato con una perdita della proprietà di staminalità e con un aumento di cellule senescenti. Nelle cellule con RB2/P130 silenziato, è stata rilevata una significativa riduzione del danno al DNA con maggiore tasso di proliferazione, un aumento della capacità di CFU ed una diminuzione dell'apoptosi. In entrambi i casi è stata osservata una up-regolazione di P107 rispetto al controllo. L'aumento dell'espressione di P107 è quindi presente nei due fenotipi completamente diversi uno dall'altro. Questo risultato, insieme con quanto osservato nelle MSC con P107 silenziato, suggerisce l'ipotesi che P107 non abbia un ruolo importante nella biologia delle MSC e che i risultati osservati siano dovuti alla concomitanza di effetti di altre proteine.

In particolare, nelle cellule con p107 silenziato, non si osserva una up-regolazione di RB, mentre quella di RB2/P130 potrebbe spiegare l'aumento del danno del DNA e la conseguente senescenza. D'altra parte, il silenziamento di RB2/P130 si associa con una diminuzione del danno al DNA e dei fenomeni correlati. E' evidente che RB2/P130 svolge un ruolo chiave nei processi coinvolti nella regolazione del danno al DNA. Va inoltre evidenziato, che le cellule prive RB non hanno mostrato un aumento della proliferazione come accade in molti altri sistemi biologici, mentre la mancanza di RB2/P130, nonostante i livelli normali di RB mostrano una maggior proliferazione cellulare.

5.4. Conclusioni

Negli ultimi anni l'ipotesi che il mancato funzionamento delle cellule staminali sia correlato al processo di vecchiaia ha preso sempre più vigore. "Ma cos'è che rende le cellule staminali così importanti?"

E' oramai provato che uno dei fattori predominanti che determinano la differenza tra le diverse cellule è l'organizzazione della cromatina. Molti studi hanno ampiamente dimostrato il ruolo dei fattori di trascrizione nel mantenimento delle caratteristiche uniche di staminalità. Tuttavia è necessario ampliare gli studi sui fattori che rimodellano la cromatina per avere una visione più chiara del fenomeno.

Anche i nostri risultati sono in buon accordo con questa ipotesi, infatti, BRG1 sembra essere coinvolto in maniera attiva in questo processo e ogni piccola variazione apportata ai livelli di espressione di BRG1 ha effetti negativi sulla fisiologia delle cellule staminali mesenchimali. La maggior parte dei geni generalmente richiede una "regolazione fine" e piccole variazioni degli stessi possono compromettere lo stato normale di una cellula. Nello specifico, questo è ciò che accade nel caso di BRG1, piccole variazioni compromettono il normale funzionamento delle MSC sia quando esso è *up*-regolato sia quando è *down*-regolato (Kholodenko, 2000, Yu et al., 2008).

Le piccole variazioni di BRG1 causano delle modifiche di un'altra classe di geni, i membri della famiglia del retinoblastoma, molto probabilmente responsabili del disfacimento cellulare. Gli studi condotti su questi ultimi hanno evidenziato il ruolo chiave svolto dalle proteine del retinoblastoma nella regolazione di diversi aspetti della biologia delle MSC: proliferazione, staminalità, commitment cellulare, senescenza e apoptosi.

I tre membri della famiglia del retinoblastoma hanno funzioni specifiche che solo parzialmente si sovrappongono. Nel dettaglio, il silenziamento di RB induce fenomeni di senescenza associati al danneggiamento del DNA. Le cellule con RB silenziato mostrano una tendenza verso il differenziamento adipocitario. Questo risultato è di grande interesse poiché dimostra che la perdita di RB non è sempre associata alla proliferazione cellulare, processo che può portare alla tumorigenesi. Il silenziamento di RB2/P130, al contrario, riduce l'apoptosi e la senescenza nelle cellule staminali mesenchimali e la loro clonogenicità. Anche le MSC con RB2/P130 silenziato mostrano una tendenza verso il differenziamento adipocitario, è interessante sottolineare che queste cellule, durante il nostro studio, sono cresciute in coltura per più di un anno senza segno apparente di trasformazione.

L'unico effetto osservato nelle cellule con P107 silenziato è stato un ridotto numero di cloni probabilmente dovuto al fatto che le MSC sono state coinvolte in un processo differenziativo.

In conclusione, un ultimo aspetto su cui porre l'accento è il possibile ruolo di RB2/P130 nel danno al DNA. Infatti, come si nota nel silenziamento di BRG1, alla spiccata up-regolazione di RB2/P130 si associa un aumento del danno al DNA come è stato rivelato dai saggi immunocitochimici. Analogamente, durante il silenziamento di RB, si assiste a un fenomeno simile, poiché l'aumento, per compensazione, di RB2/P130 è associato a un aumento del danno al DNA. Al contrario, durante il silenziamento di RB2/P130 la down-regolazione dei livelli di proteina porta a una riduzione del danno al DNA. Al termine di questa analisi sorge una domanda: "Questo fenomeno potrebbe spiegare anche l'effetto della senescenza correlato con i livelli di RB2/P130 dal momento che il danno al DNA è la causa principale della senescenza e quindi dell'invecchiamento?"

6. Bibliografia

Alessio Nicola

“Aspetti della Senescenza in cellule staminali mesenchimali: dalle modifiche alla cromatina al blocco del ciclo cellulare”

Tesi di dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Università degli Studi di Sassari

Attema JL, Pronk CJ, Norddahl GL, Nygren JM, Bryder D. Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16 INK4A-mediated senescence. *Oncogene*. 2009;28:2238-43.

Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*. 2000;28:707-15.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004;22:675-82.

Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67:9142-9.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105:829-41.

Bourgo RJ, Siddiqui H, Fox S, Solomon D, Sansam CG, Yaniv M et al. SWI/SNF deficiency results in aberrant chromatin organization, mitotic failure, and diminished proliferative capacity. *Mol Biol Cell*. 2009;20:3192-9.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*. 2006;441:349-53.

Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*. 1997;33:703-9.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120:513-22.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:729-40.

Claudio PP, Stiegler P, Howard CM, Bellan C, Minimo C, Tosi GM, Rak J, Kovatich A, De Fazio P, Micheli P, Caputi M, Leoncini L, Kerbel R, Giordano GG, Giordano A. RB2/p130 gene-enhanced expression down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in vivo. *Cancer Res*. 2001 Jan 15;61(2):462-8.

Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhammer EL. Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319:264-74.

Chalk AM, Warfinge RE, Georgii-Hemming P, Sonnhammer EL. siRNADB: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:D131-4.

Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev*. 1996;10:2794-804.

Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O et al. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*. 2008;17:376-87.

Cleaver JE, Crowley E. UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci*. 2002;7:d1024-43.

Cobrinik D, Lee MH, Hannon G, Mulligan G, Bronson RT, Dyson N et al. Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev*. 1996;10:1633-44.

Copland I, Sharma K, Lejeune L, et al.: CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Experimental Hematology* 2008, 36:93-103.

Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*. 2008;27:2801-9.

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426:194-8.

D'Errico M, Parlanti E, Dogliotti E. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat Res*. 2008;659:4-14.

Dannenbergh JH, van Rossum A, Schuijff L, te Riele H. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev*. 2000;14:3051-64.

Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J*. 1996;15:3861-70.

Diggle CP, Bentley J, Kiltie AE. Development of a rapid, small-scale DNA repair assay for use on clinical samples. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:e83.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.

Dornan D, Shimizu H, Burch L, Smith AJ, Hupp TR. The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8846-61.

Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008;23:191-205.

Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB et al. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell*. 2002;3:903-10.

Felsenfeld G, Grunstein M, Kingston R, Koshland D, Leammli U, Wolffe A, Yamamoto K. DNA e cromosomi. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli editore. 2004. 4 Edizione

- Foijer F, te Riele H. Check, double check: the G2 barrier to cancer. *Cell Cycle*. 2006;5:831-6.
- Funayama R, Saito M, Tanobe H, Ishikawa F. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol*. 2006;175:869-80.
- Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A. Stem cells and brain cancer. *Cell Death Differ*. 2006;13:5-11.
- Galderisi U, Giordano A. Short Introduction to the Cell Cycle. Cell cycle regulation and differentiation in cardiovascular and neural system. Springer editor. 2010
- Gary RK, Kindell SM. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem*. 2005;343:329-34.
- Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25:5220-7.
- Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:722-8.
- Gonos ES, Derventzi A, Kveiborg M, Agiostratidou G, Kassem M, Clark BF et al. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*. 1998;240:66-74.
- Grandi C, D'Ovidio MC, Tomao P. [Use of the comet test in occupational medicine and industrial toxicology: considerations and prospects]. *G Ital Med Lav Ergon*. 2006;28:5-13.
- Grossman L. Pre-isotopic and post-isotopic eras of DNA repair. *DNA Repair (Amst)*. 2005;4:289-91.
- Gunawardena RW, Fox SR, Siddiqui H, Knudsen ES. SWI/SNF activity is required for the repression of deoxyribonucleotide triphosphate metabolic enzymes via the recruitment of mSin3B. *J Biol Chem*. 2007;282:20116-23.
- Hansen JB, te Riele H, Kristiansen K. Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle*. 2004;3:774-8.
- Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2000;2:E65-7.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
- Helmbold H, Galderisi U, Bohn W. The switch from Rb1/p105 to Rb2/p130 in DNA damage and cellular senescence. *J Cell Physiol*.
- Hendricks KB, Shanahan F, Lees E. Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Mol Cell Biol*. 2004;24:362-76.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*. 2004;14:501-13.

Herrera RE, Sah VP, Williams BO, Makela TP, Weinberg RA, Jacks T. Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1996;16:2402-7.

Higgins C, Chatterjee S, Cherington V. The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family binding domain. *J Virol*. 1996;70:745-52.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411:366-74.

Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*. 11:11.

Jackson JG, Pereira-Smith OM. Primary and compensatory roles for RB family members at cell cycle gene promoters that are deacetylated and downregulated in doxorubicin-induced senescence of breast cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2006;26:2501-10.

Jansen-Durr P. Cell death and aging--a question of cell type. *ScientificWorldJournal*. 2002;2:943-8.

Jeyapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev*. 2008;129:467-74.

Jones DL, Rando TA. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat Cell Biol*. 13:506-12.

Jori FP, Melone MA, Napolitano MA, Cipollaro M, Cascino A, Giordano A et al. RB and RB2/p130 genes demonstrate both specific and overlapping functions during the early steps of in vitro neural differentiation of marrow stromal stem cells. *Cell Death Differ*. 2005a;12:65-77.

Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L et al. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem*. 2005b;94:645-55.

Kang H, Cui K, Zhao K. BRG1 controls the activity of the retinoblastoma protein via regulation of p21CIP1/WAF1/SDI. *Mol Cell Biol*. 2004;24:1188-99.

Kholodenko BN. Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur J Biochem*. 2000;267:1583-8.

Kidder BL, Palmer S, Knott JG. SWI/SNF-Brg1 regulates self-renewal and occupies core pluripotency-related genes in embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2009;27:317-28.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011-5.

Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res*. 1997;25:2595-7.

Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22:305-9.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 20):3613-22.

Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2004;279:53272-81.

Lee MH, Williams BO, Mulligan G, Mukai S, Bronson RT, Dyson N et al. Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev*. 1996;10:1621-32.

Liu L, Rando TA. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol*. 2011 193:257-66.

Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Jan 17;30:9.

Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*. 2005;120:497-512.

MacLellan WR, Garcia A, Oh H, Frenkel P, Jordan MC, Roos KP et al. Overlapping roles of pocket proteins in the myocardium are unmasked by germ line deletion of p130 plus heart-specific deletion of Rb. *Mol Cell Biol*. 2005;25:2486-97.

MacPherson D, Sage J, Crowley D, Trumpp A, Bronson RT, Jacks T. Conditional mutation of Rb causes cell cycle defects without apoptosis in the central nervous system. *Mol Cell Biol*. 2003;23:1044-53.

Marcotte R, Lacelle C, Wang E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev*. 2004;125:777-83.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:625-35.

Matoba R, Niwa H, Masui S, Ohtsuka S, Carter MG, Sharov AA et al. Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS One*. 2006;1:e26.

Mikkers H, Frisen J. Deconstructing stemness. *EMBO J*. 2005;24:2715-9.

- Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:252-64.
- Minamino T, Komuro I. The role of telomerase activation in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Drug News Perspect.* 2003;16:211-6.
- Morales M, Liu Y, Laiakis EC, Morgan WF, Nimer SD, Petrini JH. DNA damage signaling in hematopoietic cells: a role for Mre11 complex repair of topoisomerase lesions. *Cancer Res.* 2008;68:2186-93.
- Muchardt C, Bourachot B, Reyes JC, Yaniv M. ras transformation is associated with decreased expression of the brm/SNF2alpha ATPase from the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* 1998;17:223-31.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 7):1161-6.
- Naidu SR, Love IM, Imbalzano AN, Grossman SR, Androphy EJ. The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells. *Oncogene.* 2009;28:2492-501.
- Napolitano MA, Cipollaro M, Cascino A, Melone MA, Giordano A, Galderisi U. Brg1 chromatin remodeling factor is involved in cell growth arrest, apoptosis and senescence of rat mesenchymal stem cells. *J Cell Sci.* 2007;120:2904-11.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003;113:703-16.
- Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:692-702.
- Paggi MG, Giordano A. Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little brother. *Cancer Res.* 2001;61:4651-4.
- Pochampally R. Colony forming unit assays for MSCs. *Methods Mol Biol.* 2008;449:83-91.
- Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol.* 2003;56:86-96.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71-4.
- Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen.* 2001;37:241-83.
- Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009;69:5331-9.

- Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*. 2003;424:223-8.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. 1998;12:2831-41.
- Saladi SV, de la Serna IL. ATP dependent chromatin remodeling enzymes in embryonic stem cells. *Stem Cell* 2010 Rev.6:62-73.
- Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*. 2007;39:573-6.
- Scime A, Li L, Ciavarra G, Whyte P. Cyclin D1/cdk4 can interact with E2F4/DP1 and disrupts its DNA-binding capacity. *J Cell Physiol*. 2008;214:568-81.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*. 2006;5:91-116.
- Seviour EG, Lin SY. The DNA damage response: Balancing the scale between cancer and ageing. *Ageing (Albany NY)*.2:900-7.
- Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:703-13.
- Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem*. 1995;270:9420-8.
- Strober BE, Dunaief JL, Guha, Goff SP. Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol*. 1996;16:1576-83.
- Sudarsanam P, Winston F. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet*. 2000;16:345-51.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663-76.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:726-36.
- van Harmelen V, Skurk T, Hauner H. Primary culture and differentiation of human adipocyte precursor cells. *Methods Mol Med*. 2005;107:125-35.
- von Zglinicki T, Burkle A, Kirkwood TB. Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol*. 2001;36:1049-62.
- Wang HG, Yaciuk P, Ricciardi RP, Green M, Yokoyama K, Moran E. The E1A products of oncogenic adenovirus serotype 12 include amino-terminally modified forms able to bind the retinoblastoma protein but not p300. *J Virol*. 1993;67:4804-13.

Wang W, Cote J, Xue Y, Zhou S, Khavari PA, Biggar SR et al. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* 1996;15:5370-82.

Xie L, Tsapralis G, Chen QM. Proteomic identification of insulin-like growth factor-binding protein-6 induced by sublethal H₂O₂ stress from human diploid fibroblasts. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4:1273-83.

Yamanaka S, Takahashi K. [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2006;51:2346-51.

Yu K, Ganesan K, Tan LK, Laban M, Wu J, Zhao XD et al. A precisely regulated gene expression cassette potently modulates metastasis and survival in multiple solid cancers. *PLoS Genet.* 2008;4:e1000129.

Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX et al. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell.* 2000;101:79-89.

Zhu L. Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator. *Eur J Cancer.* 2005;41:2415-27.

Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 2003;17:1146-9.

Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol.* 2009;219:3-15.